

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig–Maximilians–Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Differenzierung und angiogenes Potenzial humaner mesenchymaler
Stammzellen in Abhängigkeit von tumorkonditioniertem Medium des
Glioblastoma multiforme

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von
Jenna Hildebrandt
aus Hannover

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|--|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Andreas Straube |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. Dr. med. Ullrich Schüller Prof. Dr. med. Walter Nathrath |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Dr. med. Tobias Birnbaum |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 05.05.2011 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Einführung und Ziele der Arbeit | 1 |
| 1.2 | Das Glioblastoma multiforme | 3 |
| 1.2.1 | Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose | 3 |
| 1.2.2 | Symptomatik und Diagnostik | 4 |
| 1.2.3 | Klassifikation und pathobiologische Charakterisierung | 5 |
| 1.2.4 | Derzeitige Behandlungsstrategien und ihre Limitation | 9 |
| 1.2.5 | Tumorinduzierte Neovaskularisation | 12 |
| 1.2.6 | Anti-angiogen ausgerichtete Therapien | 13 |
| 1.2.7 | Weitere experimentell therapeutische Ansätze | 15 |
| 1.3 | Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks | 17 |
| 1.3.1 | Herkunft, Phänotyp und Differenzierungspotenzial | 17 |
| 1.3.2 | Potenzial als therapeutische Vektoren | 18 |
| 1.3.3 | Pro-angiogene Faktoren mesenchymaler Stammzellen | 19 |
| 1.4 | Auswahl der Primärantikörper | 21 |
| 1.4.1 | Endothelzellmarker | 21 |
| 1.4.2 | Marker glatter Muskelzellen | 22 |
| 1.4.3 | Perizytäre Marker | 24 |
| 2 | Methoden | 27 |
| 2.1 | Zellkultur | 27 |
| 2.1.1 | Isolierung und Kultivierung primärer humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark | 27 |
| 2.1.2 | Kultivierung primärer U373-Gliomzellen | 28 |
| 2.1.3 | Gewinnung eines tumorkonditionierten Mediums aus U373-Kulturen (CM) | 29 |
| 2.1.4 | Kultivierung primärer humaner Endothelzellen (HUVEC) | 29 |
| 2.1.5 | Kultivierung vaskulärer glatter Muskelzellen (HAoSMC) | 30 |
| 2.1.6 | Passagieren von Zellen | 31 |
| 2.1.7 | Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität | 31 |
| 2.1.8 | Kryokonservierung von Zellen | 32 |
| 2.2 | Fluorescence Activated Cell Sorting-Analyse | 32 |
| 2.3 | Immunologische Fluoreszenz-Färbungen | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4 | Matrigel Tube Formation Assay | 35 |
| 2.5 | Statistik | 36 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Charakterisierung der hMSC | 37 |
| 3.1.1 | Ergebnisse der FACS-Analyse | 37 |
| 3.1.2 | Kulturverlauf isolierter hMSC in Standardmedium (MEM-20%) . . | 38 |
| 3.2 | Abhängigkeit der hMSC-Morphologie von gliomkonditioniertem Medium . | 39 |
| 3.3 | Immunologische Phänotypisierung der hMSC in Abhängigkeit von gliomkonditioniertem Medium | 41 |
| 3.4 | CM-induzierte Bildung mikrovaskulärer Strukturen bei hMSC und HUVEC | 55 |
| 3.4.1 | Anzahl neu gebildeter Tubes aus hMSC und HUVEC | 56 |
| 3.4.2 | Anzahl der Branching points innerhalb der hMSC- und HUVEC-Netzwerke | 57 |
| 3.4.3 | Länge der gebildeten Tubes aus hMSC und HUVEC | 57 |
| 4 | Diskussion | 60 |
| 4.1 | Charakterisierung der verwendeten hMSC-Kultur | 60 |
| 4.1.1 | Identifikation isolierter Zellen mittels FACS-Analyse | 60 |
| 4.1.2 | hMSC weisen in Anwesenheit von CM andere morphologische Eigenschaften auf als in dessen Abwesenheit | 61 |
| 4.2 | Immunphänotypische Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen . . . | 62 |
| 4.2.1 | Nachweis von Markern glatter Muskelzellen auf hMSC | 62 |
| 4.2.2 | Nachweis von Endothelzellmarkern auf hMSC | 63 |
| 4.2.3 | Das Gesamtprofil der getesteten Marker spricht für eine perizytäre Differenzierung der CM-hMSC | 65 |
| 4.3 | Angiogenes Potenzial der CM-hMSC in-vitro | 67 |
| 4.3.1 | hMSC zeigen ein angiogenes Potenzial, das durch die Anwesenheit von CM verstärkt wird | 67 |
| 4.3.2 | Die Tube-Netzwerke gliomkonditionierter hMSC grenzen sich von Endothelzellen ab | 69 |
| 4.3.3 | CM-hMSC bilden vergleichbare Zellgeflechte im TFA | 70 |
| 4.4 | Möglicher Beitrag mesenchymaler Stammzellen zur Tumorstabilität des GBM | 71 |
| | Zusammenfassung | 74 |
| A | Materialien | 97 |
| A.1 | Zelllinien | 97 |
| A.2 | Antikörper | 97 |
| A.3 | Kulturmedien, Puffer und Reagenzien | 98 |
| A.4 | Verbrauchsmaterialien | 99 |
| A.5 | Geräte | 99 |
| A.6 | Software | 100 |

| | |
|--------------------|---|
| Inhaltsverzeichnis | 6 |
|--------------------|---|

| | |
|--------------|-----|
| B Danksagung | 101 |
|--------------|-----|

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Makroskopisches und histologisches Erscheinungsbild des Glioblastoms . . | 7 |
| 3.1 | Ergebnisse der FACS-Analyse isolierter Stammzellen aus humanem Knochenmark | 38 |
| 3.2 | Repräsentativer Kulturverlauf primärer hMSC | 39 |
| 3.3 | hMSC-Morphologie in Abhängigkeit von CM | 40 |
| 3.4 | Übersicht Fluoreszenzfärbung | 43 |
| 3.5 | α -SMA-Fluoreszenzfärbung | 45 |
| 3.6 | Desmin-Fluoreszenzfärbung | 46 |
| 3.7 | Myosin-Fluoreszenzfärbung | 47 |
| 3.8 | CD 151-Fluoreszenzfärbung | 48 |
| 3.9 | vWF-Fluoreszenzfärbung | 48 |
| 3.10 | VE-Cadherin-Fluoreszenzfärbung | 49 |
| 3.11 | Nestin-Fluoreszenzfärbung | 50 |
| 3.12 | NG2-Fluoreszenzfärbung | 51 |
| 3.13 | Immunfluoreszenzfärbung der Muskelzellmarker α -SMA und Desmin | 52 |
| 3.14 | Immunfluoreszenzfärbung der Endothelzellmarker CD 151 und VE-Cadherin | 53 |
| 3.15 | Immunfluoreszenzfärbung der Perizytenmarker Nestin und NG2 | 54 |
| 3.16 | Bildung dreidimensionaler tubulärer Strukturen von hMSC und HUVEC in Abhängigkeit von CM | 55 |
| 3.17 | Anzahl der Tubes in Abhängigkeit von CM | 56 |
| 3.18 | Anzahl der Branching points in Abhängigkeit von CM | 58 |
| 3.19 | Länge der Tubes in Abhängigkeit von CM | 59 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | WHO-Klassifikation primärer Hirntumoren nach histologischer Gradeinteilung | 6 |
| 1.2 | Wachstumsfaktoren bzw. -Rezeptoren maligner Gliomzellen | 8 |
| 1.3 | Wachstumsfaktoren mesenchymaler Stammzellen | 20 |
| 2.1 | Zusammensetzung des Wachstumsmediums MEM-20% für hMSC | 27 |
| 2.2 | Zusammensetzung des Kulturmediums MEM-10% für Glioblastomzellen . . | 28 |
| 2.3 | Zusammensetzung des Mediums MEM-0% zur Herstellung tumorkonditionierten Mediums | 29 |
| 2.4 | Charakterisierung der verwendeten HUVEC-Kultur nach Herstellerangaben | 30 |
| 2.5 | Zusammensetzung des Wachstumsmediums für HUVEC-Kulturen (ECGM) | 30 |
| 2.6 | Zusammensetzung des Wachstumsmediums für HAoSMC-Kulturen | 30 |
| 2.7 | Zusammensetzung der <i>Blocking solution</i> | 33 |
| 2.8 | Verwendete Primärantikörper | 34 |
| 2.9 | Zusammensetzung der Primärantikörper-Lösung | 34 |
| 3.1 | Ergebnis der Fluoreszenzintensität auf hMSC für die getesteten Marker in CM, MEM-20% und MEM-0% | 42 |
| 4.1 | Profil der getesteten Marker | 67 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|--|
| α -SMA | α -Smooth muscle actin |
| Ak | Antikörper |
| Ang-2 | Angiopoietin-2 |
| bcl-2 | <i>B-cell lymphoma-2</i> |
| bFGF | <i>Basic fibroblast growth factor</i> |
| BRM | <i>Biological response modifiers</i> |
| CFU-Fs | <i>Fibroblastic colony-forming units</i> |
| CM | Tumorkonditioniertes Medium |
| CM-hMSC ... | in CM inkubierte hMSC |
| CT | Computertomographie |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethyl-sulfoxid |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ESC | Embryonale Stammzellen |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> |
| FBS | <i>Fetal bovine serum</i> |
| FGF-2 | <i>Basic fibroblast growth factor</i> |
| FI | Fluoreszenzintensität |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| GFAP | <i>Glial fibrillary acidic protein</i> |
| Gy | Energiedosis-Einheit Gray |
| HIF | <i>Hypoxia-inducible factor</i> |
| HLA-II | <i>Human leucocyte antigen-II</i> |
| hMSC | Humane mesenchymale Stammzellen |
| HUVEC | humane vaskuläre Endothelzellen |
| IGF-1 | <i>Insulin-like growth factor-1</i> |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| MEM-0% | serumfreies Medium |

| | | |
|----------------|-------|---|
| MEM-20% | ... | Serumhaltiges Medium für hMSC (20% FBS) |
| MGMT | | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase |
| MMP | | Matrix-Metalloproteinase |
| MRT | | Magnetresonanztomographie |
| NG2 | | <i>Nerv/glia antigen 2</i> |
| NGS | | <i>Normal goat serum</i> |
| NT-3 | | Neurotrophin-3 |
| PBS | | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PC | | Perizyten |
| PDGF | | <i>Platelet-derived growth factor</i> |
| RT | | Raumtemperatur |
| SMC | | glatte Muskelzellen, <i>Smooth muscle cells</i> |
| TFA | | <i>Tube formation assay</i> |
| TGF- α | | <i>Transforming growth factor alpha</i> |
| TGF- β 1 | | <i>Transforming growth factor-β1</i> |
| TRITC | | Rhodamin-isothiocyanat |
| VCAM-1 | | <i>Vascular adhesion molecule-1</i> |
| VEGF-A | | <i>Vascular endothelial growth factor-A</i> |
| VEGFR2 | | <i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i> |
| vWF | | Von Willebrand-Faktor |
| WHO | | Weltgesundheitsorganisation |
| ZNS | | Zentrales Nervensystem |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Einführung und Ziele der Arbeit

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste maligne hirneigene Tumor des Erwachsenen mit einer sehr schlechten Prognose [1]. Zusätzlich zu konventionellen Therapiemaßnahmen für Patienten mit GBM besteht weiterhin zunehmendes Interesse an der Etablierung neuer Behandlungsformen, welche die Pathobiologie des Tumors gezielter berücksichtigen können. Neurochirurgische Resektion und adjuvante Radio- und Chemotherapie können die Prognose nicht wesentlich verbessern, da Glioblastomzellen frühzeitig in gesundes Hirngewebe disseminieren und wenig chemosensibel sind [2]. Dadurch entziehen sie sich derzeitigen Therapiemaßnahmen, die größtenteils auf den Tumor und das unmittelbar peritumorale Milieu limitiert sind [3].

Es konnte gezeigt werden, dass die Prognose des GBM signifikant mit seiner Vaskularisationsdichte korreliert [4]. Das schnelle Tumorwachstum des GBM führt zur insuffizienten intratumoralen Gewebeoxygenierung und Veränderungen der dortigen extrazellulären Matrix zu vaskulärer Proliferation [5]. Diese neu gebildeten Gefäße zeichnen sich durch ihre abnorm gesteigerte Permeabilität aus, die nicht nur die Migration der Tumorzellen erleichtert, sondern auch den Gewebeschaden durch vermehrte Ödembildung aggraviert [6]. Die tumorinduzierte Neovaskularisation stellt also aus mehreren Gründen einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen dar. Obwohl verschiedenste anti-angiogen ausgerichtete Therapiestrategien bisher mit teils vielversprechenden Ergebnissen in den letzten Jahren untersucht worden sind, steht bis heute keine spezifische anti-angiogene Therapie für das GBM zur Verfügung [7]. Dies liegt zu einem wesentlichen Teil daran, dass die Zelltypen und Zytokine, die bei der pathologischen Neovaskularisation eine wichtige

Rolle spielen, noch nicht hinreichend identifiziert worden sind.

Es besteht zunehmende Evidenz, dass humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes (hMSC) eine Rolle in der tumorinduzierten Neovaskularisation spielen. Eine Vielzahl an Chemokinen, die die Neovaskularisation innerhalb des Tumormilieus modulieren, konnte in den letzten Jahren identifiziert werden, beispielsweise *Vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A), Interleukin-8 (IL-8), *Transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) und Neurotrophin-3 (NT-3) [8–10]. Diese werden von Glioblastomzellen grundsätzlich überexprimiert, und durch Hypoxie im Inneren der Tumormasse kann diese Expression über den Transkriptionsfaktor *Hypoxia-inducible factor* (HIF) zusätzlich verstärkt werden [11]. Interessanterweise spielen diese Chemokine nicht nur eine Rolle bei der Neovaskularisation, sondern auch im tumorinduzierten Tropismus mesenchymaler Stammzellen [12–15]. In vorangegangenen Migrationsassays unserer Arbeitsgruppe übten diese Chemokine einen starken pro-migratorischen Reiz auf hMSC aus [12]. Des weiteren scheinen hMSC eine Funktion innerhalb der neu entstandenen Gefäße zu haben, da ihre Integration in deren Gefäßwände demonstriert werden konnte [16, 17]. Es stellt sich demnach die Frage, ob hMSC möglicherweise durch Beteiligung an der Neovaskularisation zur Stabilität des Tumorstwachstums und somit zur Malignität beitragen. Funktion und Phänotyp der hMSC innerhalb des Tumormilieus sind bisher unzureichend erforscht.

hMSC besitzen als multipotente Zellen ein großes Differenzierungspotenzial, das auch Transdifferenzierungen einschließt. So konnte die Differenzierung zu Zelltypen aller drei Grundgewebeschnichten, Meso-, Ento- und Ektoderm, demonstriert werden [18]. Im Hinblick auf mögliche Funktionen innerhalb der perivaskulären Nische des GBM ist insbesondere das Differenzierungspotenzial zu vaskulären Endothelzellen und muralen Zellen wie vaskulären glatten Muskelzellen (SMC) und Perizyten (PC) von Bedeutung [19–21]. Diese Zellen spielen unterschiedliche Rollen in der perivaskulären Nische des GBM, beispielsweise bei der Neovaskularisationsinduktion (Sprouting) oder der Stabilisation der Blut-Hirn-Schranke.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Funktion und Phänotyp humaner mesenchymaler Stammzellen *in-vitro* in Abhängigkeit von tumorkonditioniertem Medium zu untersuchen. hMSC wurden dazu aus Knochenmarkaspiraten mehrerer Patienten isoliert und per Durchflusssyztometrie (FACS-Analyse) charakterisiert. Serumfreies, tumorkonditioniertes Medium (CM) wurde aus Glioblastomzellkulturen (U373) gewonnen. Nach Inkubation passagierter hMSC

mit einer CM-Konzentrationsreihe, serumhaltigem (MEM-20%) und serumfreiem Kontrollmedium (MEM-0%) wurde ihr Phänotyp morphologisch und mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden Primärantikörper sowohl gegen die Marker glatter Muskelzellen α -Smooth muscle actin (α -SMA), Desmin, glattmuskuläres Myosin, als auch gegen die Endothelzellmarker VE-Cadherin, Von-Willebrand Faktor (vWF) und CD 155 sowie gegen die perizytären Marker Nestin und *Nerval/glial antigen 2* (NG2) verwendet. Zusätzlich wurde das angiogene Potenzial der hMSC in Abhängigkeit von CM mittels *Tube formation assay* (TFA) untersucht. Diese artifizielle extrazelluläre Matrix (ECM) ermöglicht es Zellen mit angiogenem Potenzial zu migrieren und dreidimensionale, kapilläre Netzwerke zu bilden [22]. Als Positivkontrolle dienten humane vaskuläre Endothelzellen (HUVEC). Das angiogene Potenzial wurde dann aus der Anzahl neu gebildeter, kapillarähnlicher Strukturen (Tubes), der Anzahl interzellulärer Verzweigungspunkte innerhalb des Netzwerkes (Branching points) sowie aus der Länge der gebildeten Tubes ermittelt. Hier wurden die Assays anhand einer Konzentrationsreihe mit tumorkonditioniertem Medium auf eine Abhängigkeit der Gefäßneubildung zur Chemokinkonzentration untersucht.

Im Hinblick auf potenzielle Funktionen innerhalb der perivaskulären Nische des Glioblastoms stellt die Untersuchung einer möglichen funktionellen Transdifferenzierung der hMSC zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Perizyten einen interessanten Aspekt dar, da diese Zellen einen Beitrag zur Neovaskularisation und Stabilisierung der Tumorgefäße leisten können.

1.2 Das Glioblastoma multiforme

1.2.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und aggressivste primäre Hirntumor des Erwachsenen und seine Therapie stellt weiterhin eine große multidisziplinäre Herausforderung dar. Trotz Fortschritten in Mikroneurochirurgie und Radiotherapie, verbesserter Bildgebung und Einsatz moderner Zytostatika liegt die mediane Überlebenszeit bei 14 Monaten nach Diagnosestellung mit maximaler Therapie [1].

Das GBM macht 20% aller intracranialen Tumoren und 52% aller parenchymalen Hirntumoren aus, und seine Häufigkeit variiert je nach Literaturangabe zwischen 2,9 und 3,5 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr in Europa und Nordamerika [23–26]. Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen (m : w = 1,5-1,7 : 1) [24]. Das Glioblas-

tom kann in jedem Lebensalter auftreten, wobei der Altersgipfel zwischen 45 und 70 Jahren liegt [27]. Für Risikofaktoren wie Rauchen, Niederfrequenz-modulierte HF-Strahlung durch Mobiltelefone oder elektromagnetische Felder konnten keine Zusammenhänge nachgewiesen werden [28–30], wohingegen ionische Strahlung als Mitursache diskutiert wird [24, 31]. Die meisten Glioblastome treten sporadisch auf, werden jedoch auch mit einigen seltenen, genetisch bedingten Syndromen in Zusammenhang gebracht, wie der Neurofibromatose, der tuberösen Sklerose, der Von-Hippel-Lindau-Erkrankung, dem Li-Fraumeni- und dem Turcot-Syndrom [32]. Als prognostisch günstige Faktoren erweisen sich ein niedriges Lebensalter, ein guter initialer Karnofsky-Index (Skala zur Einschätzung der Einschränkung von Aktivität, Selbstversorgung und Selbstbestimmung bei Patienten mit bösartigen Tumoren [33]) sowie der Nachweis einer Methylierung in der Promotorregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-(MGMT-)Gens (siehe Kap. 1.2.4) [34, 35].

1.2.2 Symptomatik und Diagnostik

Symptomatik

Die Art der Symptome ist stark von Lokalisation und Ausdehnung des Tumors abhängig. Eine rasche Progredienz der Symptomatik zeigt sich häufig erst bei fortgeschrittener Ausdehnung des Tumors. Neben epileptischen Anfällen, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen oder Hemiparese sind vor allem progressive Defizite der Gedächtnisleistung und Persönlichkeitsveränderung aufgrund der häufigen Beteiligung von Temporal- und Frontallappen zu beobachten. Des weiteren können lokalisationsabhängig fokale neurologische Defizite wie Aphasien oder Sehstörungen auftreten. Hirndruckzeichen wie Stauungspapille, Somnolenz und Koma treten spät auf und sind prognostisch ungünstig [36].

Diagnostik

Gestützt wird die Verdachtsdiagnose zunächst durch bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT). Im CT mit Kontrastmittel stellt sich das GBM als unregelmäßige Raumforderung mit randständiger Kontrastmittelaufnahme dar (sog. *ringförmiges Enhancement*), bei größeren Tumoren auch mit typisch girlandenförmiger Formation und einem ausgeprägten Hirnödem. Im MRT grenzen sich charakteristischerweise solide, kontrastmittelreiche von zystischen und hämorrhagischen Arealen ab. Letztendlich ist das Erscheinungsbild des GBM in der Bildgebung jedoch äußerst variabel und damit unspezifisch [37]. Die Diagnosestellung eines suspekten Herdes

erfolgt durch den Neuropathologen und bedarf einer stereotaktischen Biopsie oder einer Craniotomie mit Tumorresektion [38].

1.2.3 Klassifikation und pathobiologische Charakterisierung

Klassifikation primärer Hirntumoren

Gliome sind primäre Hirntumoren, die sich histologisch von Gliazellen ableiten. Die Subtypisierung von Gliomen bestimmt deren Prognose und Behandlungsform. Daher ist es erforderlich, stereotaktisch reseziertes Tumorgewebe histologisch zu klassifizieren. Die derzeit gültige Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) beruht auf histogenetischen Überlegungen, d.h. Gliome werden demjenigen Zelltyp zugeordnet, mit dem sie wesentliche Merkmale teilen und von dem sie sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit herleiten [39]. Neben der Einteilung nach glialem Zelltyp in Ependymome, Oligodendrogliome, gemischtzellige Oligoastrozytome und Astrozytome wird der histologische Grad der Zelldifferenzierung berücksichtigt. Das Glioblastoma multiforme zählt zu den Astrozytomen und entspricht aufgrund seiner schlechten Differenzierung einem Grad IV-Astrozytom. Weiterhin gehören das pilozytische Astrozytom (Grad I), das differenzierte (Grad II) sowie das anaplastische (Grad III) Astrozytom und pleomorphe Xanthoastrozytome (Grad I–III) in diese Gruppe (Tabelle 1.1) [39].

Pathologie

Im Gegensatz zu Oligodendrogliomen kann das GBM sowohl die graue als auch die weiße Substanz infiltrieren [40]. Sobald der Tumor meningeal oder ventrikulär einbricht, kann sich dies in einem erhöhten Proteingehalt des Liquors und mitunter einer lymphozytären Pleozytose widerspiegeln. Maligne Zellen können diffus oder multifokal bis in die Leptomeningen vordringen und dort zu einer meningealen Gliomatose führen. Metastasen außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) sind allerdings eine Seltenheit. Etwa 50% der Glioblastome manifestieren sich in mehr als einem Lappen einer Hemisphäre oder sind bilateral, beispielsweise als sog. *butterfly*-Gliom mit Ausbreitung über das Corpus callosum in die kontralaterale Hemisphäre [36].

Glioblastome können sowohl *de novo* als auch durch Progression aus Astrozytomen niedrigerer Malignität entstehen. In den meisten Fällen bildet sich das GBM nicht auf dem Boden einer vorangegangenen Läsion, wenngleich sogar Fälle der sekundären Malignisierung von Oligodendrogliomen [41] oder die Entwicklung eines Glioblastoms aus Ependymomen

| Entität primärer Hirntumoren | WHO-Grad |
|--|----------|
| Astrozytäre Tumoren | |
| pilozytisch | 1 |
| differenziert (diffus, infiltrativ, fibrillär) | 2 |
| anaplastisch | 3 |
| pleomorphes Xanthoastrozytom | 1-3 |
| Glioblastom | 4 |
| Oligodendrogliale Tumoren und gemischte Gliome | |
| gut differenziertes Oligodendrogliom | 2 |
| anaplastisches Oligodendrogliom | 3 |
| gemischtes Oligodendrogliom/Astrozytom* | 2 |
| gemischtes anaplastisches Oligodendrogliom/Astrozytom* | 3 |
| Glioblastom mit Oligodendrogliom-Komponente | 4 |
| Ependymale Tumoren | |
| Myxopapilläres Ependymom | 1 |
| Ependymom | 2 |
| anaplastisches Ependymom | 3 |
| Plexus-choroideus Tumoren | 1-3 |
| Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren | 1-2 |
| Pineal-parenchymatöse Tumoren | 2-4 |
| Embryonale Tumoren | 4 |
| Meningeale Tumoren | 1-3 |

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation primärer Hirntumoren nach histologischer Gradeinteilung (gekürzt nach [39]). * Gemischte Tumoren, die aus Oligodendrogliom/anaplastischem Astrozytom bzw. anaplastischem Oligodendrogliom/Astrozytom bestehen, werden normalerweise nach dem höheren WHO-Grad klassifiziert, obwohl in dieser Hinsicht kein Konsens seitens der WHO existiert.

beschrieben wurden [42]. Des weiteren können sich Astrozytome im Rezidiv als Glioblastom manifestieren. Diese sogenannten sekundären Glioblastome treten eher bei jüngeren Patienten um das 40. Lebensjahr auf [43].

Der makroskopische Aspekt des Glioblastoms ist durch seine inhomogene und vielfältige (multiforme) Erscheinung gekennzeichnet. Die Tumorschnittfläche weist häufig Einblutungen, gelbliche, bandförmige Nekrosen, Gallertzysten, Gefäßreichtum und Verkalkungen auf (Abb. 1.1, A). Histologisch handelt es sich um zellreiche, astrozytär differenzierte Tumo-

ren, die diffus das umgebende, reaktiv veränderte Hirngewebe infiltrieren. Die Tumorzellen weisen multipolare, feine Fortsätze auf und sind palisadenförmig angeordnet. Es kommen auch mehrkernige Riesenzellen oder kleinzellige, zytoplasmaarme Varianten vor. Die Zellkerne sind meist chromatinreich und polymorph. Die mitotische Aktivität ist stark erhöht (Abb. 1.1, B) [36]. Für die Diagnose des Glioblastoms ist insbesondere die Abgrenzung zu anaplastischen Astrozytomen von Bedeutung (WHO Grad III). Den entscheidenden Hinweis im histologischen Präparat gibt der Nachweis zweier charakteristischer Merkmale des GBM: strichförmige Tumornekrosen und hochgradig pathologische Blutgefäße [39].

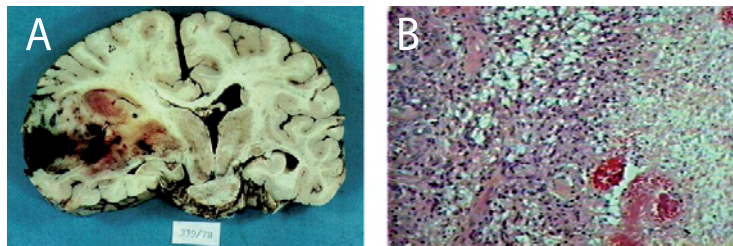


Abbildung 1.1: Makroskopisches und histologisches Erscheinungsbild des Glioblastoms. (A) Koronarer Hirnschnitt mit Glioblastoma multiforme vorwiegend rechts temporal [44]. (B) Nekrosen (rechts) und Palisaden (links) im histologischen Schnitt eines GBM [45].

Pathobiologie

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte hat das Wissen über die Mechanismen der Entstehung und Progression maligner Gliome deutlich zugenommen [46]. Dies hat wesentlich dazu beigetragen, mögliche Angriffsziele für neue Therapien wie beispielsweise der Gentherapie zu identifizieren und ermöglicht in Zukunft ein spezifischeres Vorgehen gegen die Tumorzellen.

Wie bei anderen Krebserkrankungen gehen der Bildung und Progression maligner Gliome die Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Außerkraftsetzung apoptotischer Gene und Dysregulation von DNA-Reparaturgenen voraus. Verschiedene Konstellationen genetischer Alterationen sind mit spezifischen Typen maligner Gliome, dem jeweiligem Tumorgrad und unterschiedlichem Ansprechen auf spezielle Therapieformen assoziiert [39,47]. Diese genetischen Konstellationen resultieren in wichtigen onkogenen Eigenschaften wie der Überexpression von Wachstumsfaktoren, der Migration und Invasion von Tumorzellen und der Neovaskularisationsinduktion.

Glioblastomzellen produzieren eine hohe Anzahl onkogen wirksamer Wachstumsfaktoren. Dabei können sie sowohl Liganden, als auch deren Rezeptoren produzieren, und schaffen

somit einen autokrinen, sich selbst verstärkenden Signalweg. Einige dieser Faktoren werden bereits in niedrigmalignen Gliomen exprimiert, wohingegen andere nur von GBM-Zellen produziert werden. In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten Wachstumsfaktoren aufgeführt, die von malignen Gliomzellen exprimiert werden [48].

| Wachstumsfaktor bzw. -Rezeptor (engl. Bezeichnung) | Abkürzung |
|--|---------------|
| Vascular endothelial growth factor | VEGF |
| Platelet-derived growth factor | PDGF |
| Epidermal growth factor receptor | EGFR |
| Basic fibroblast growth factor | bFGF, FGF-2 |
| Transforming growth factor alpha | TGF- α |
| Insulin-like growth factor-1 | IGF-1 |

Tabelle 1.2: Von malignen Gliomzellen überexprimierte Wachstumsfaktoren bzw. -Rezeptoren (Auswahl; nach [48]).

Eines der wichtigsten Resultate der intrazellulären Dysregulationen in GBM-Zellen ist deren Fähigkeit zur Migration auch in distale Anteile des Hirnparenchyms [49, 50]. Die Mechanismen dieser Disseminierung sind bislang unklar, werden jedoch wahrscheinlich durch Interaktionen zwischen Tumorzellen und Zellen der unmittelbaren Umgebung bedingt. Migrierte GBM-Zellen entziehen sich dadurch jenen konventionellen Therapiemaßnahmen, die auf die Haupttumormasse limitiert sind. Dies ist einer der Hauptgründe für die hohen Rezidivraten des Glioblastoms.

Ein weiteres Phänomen in der Pathobiologie des Glioblastoms liegt in der Induktion der Neovaskularisation. Die größte Rolle spielt dabei die Überexpression von VEGF. VEGF ist ein löslicher Faktor, der mit hoher Affinität an Rezeptoren von Endothelzellen bindet und dort als potentes, spezifisches Mitogen wirkt [51]. VEGF ist einer der Haupttrigger der Angiogenese, sowohl unter physiologischen [52], als auch pathologischen Bedingungen [53] und gilt als Katalysator der Neovaskularisation in humanen Gliomen [54, 55]. Darüber hinaus steigert VEGF die Permeabilität von Gefäßen, moduliert damit die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und führt zu verstärkter Ödembildung und Hyperkoagulabilität [56, 57].

Andere lösliche Faktoren, die bei der Neovaskularisation eine Rolle spielen, sind v.a. PDGF, EGF, FGF-2 und TGF- α [58–61]. PDGF steht für eine Familie von Isoformen eines Wachstumsfaktors, der eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Tumoriangiogenese einnimmt [58, 59]. Das Homodimer PDGF-AA und das Heterodimer PDGF-AB werden auch als *Glioma-derived-growth factor* bezeichnet. Die beiden Isoformen PDGF-AB und PDGF-BB sind als potentes Mitogen vaskulärer glatter Muskelzellen identifiziert worden [62].

Darüber hinaus moduliert PDGF-BB die Bildung und Sekretion von ECM-Bestandteilen [63]. Zusammen erleichtern sie die Bildung funktionsfähiger Blutgefäße. FGF-2 hingegen hat Einfluß auf die Zellproliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen [64] und wird von diesen auch in hohen Mengen gebildet, wenn lokale Tumorzellen proliferieren [65, 66].

Da die tumorinduzierte Neovaskularisation in dieser Arbeit einen besonderen Stellenwert einnimmt, wird diese Thematik gesondert in Kapitel 1.2.5 erörtert.

1.2.4 Derzeitige Behandlungsstrategien und ihre Limitation

Angestrebt wird die möglichst vollständige neurochirurgische Resektion der Tumormasse unter Berücksichtigung der damit verbundenen Schädigung gesunden Hirngewebes und drohender fokaler Ausfälle [38]. Diese Maßnahme verlangsamt das Fortschreiten der Erkrankung, kann diese jedoch wegen mikroskopischer Disseminierung im ZNS nicht verhindern. Im Anschluss an die makroskopische Tumoresektion erfolgt daher meist eine Radiotherapie, ggf. mit Chemotherapie, mit dem Ziel, die rezidivfreie und absolute Überlebenszeit zu verlängern [67]. Durch symptomatische Maßnahmen wie der Reduktion des Begleitödems durch Dexamethason kann kurzfristig eine klinische Besserung erreicht werden [38].

Neurochirurgie

Trotz der fortdauernden Kontroversen in der chirurgischen Neuroonkologie ist die möglichst vollständige Resektion des kontrastmittelaufnehmenden Tumors derzeitiger Standard bei der Behandlung des Glioblastoms [68]. Die Exzision von 98% der Tumormasse und mehr konnte mit einer signifikant verlängerten Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden [69]. Die Chance, initial möglichst viel Tumormasse zu entfernen, steigt durch Anwendung intraoperativer Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure [70]. Kombiniert wird die Radikalresektion mit nachfolgender Strahlentherapie und konkomitanter sowie adjuvanter Therapie mit Temozolomid, einem Imidazotetrazin-Derivat (siehe unten). Unter dieser kombinierten Behandlung wird eine Steigerung der 2-Jahres-Überlebensrate auf bis zu 26% im Vergleich zu 10% bei alleiniger Strahlentherapie erreicht. Die mediane Überlebenszeit beträgt 15 versus 12 Monate, das progressionsfreie Überleben 7,2 versus 5 Monate [71]. Trotz modernster Operationstechniken durch Neuronavigation oder funktionskontrollierter Neurochirurgie lässt sich die Resektion gesunden Gewebes nicht verhindern.

Das GBM ist ein rasch infiltrativ-destruierend wachsender Tumor, der sich weniger durch

systemische Metastasen als durch die invasive Streuung zahlreicher Tumorsatelliten in das Hirngewebe auszeichnet. Zum Zeitpunkt des neurochirurgischen Tumor-Debulking sind Teile des ZNS meist schon diffus infiltrativ durchsetzt. Diese Mikrosatelliten sind weder in der Bildgebung noch intraoperativ sicher vom umliegenden gesunden Nervengewebe abzugrenzen und stellen den Hauptgrund für die hohe Rezidivquote trotz makroskopisch vollständiger Resektion dar [72]. Weitere limitierende Faktoren sind die Zugänglichkeit des Tumors sowie die Verursachung bzw. Aggravierung fokalneurologischer Defizite bei der Resektion gesunden Gewebes.

Chemotherapie und Radiochemotherapie

Die Chemotherapie kann die mediane Überlebenszeit und die Lebensqualität einiger Patienten mit GBM verbessern, wenn sie in Kombination mit Neurochirurgie und Radiotherapie erfolgt [38]. Eingesetzt werden insbesondere das alkylierende Zytostatikum Temozolomid oder lipidlösliche Nitroseharstoffe wie Carmustin (BCNU) bzw. eine Dreierkombination aus Procarbazin, Lomustin (CCNU) und Vincristin.

Temozolomid ist das neueste orale Zytostatikum, das standardmäßig zur simultanen und adjuvanten Therapie von Glioblastomen in Kombination mit Strahlentherapie eingesetzt wird. Es überwindet die Blut-Hirn-Schranke, erhöht die Strahlensensibilität von Tumoren bei simultaner Radiotherapie und ist vergleichsweise gut verträglich. Insbesondere Patienten mit Nachweis einer auf Hypermethylierung des Promotors beruhenden Inaktivierung des DNA-Reparaturenzyms O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) können von der Chemotherapie mit Temozolomid profitieren [71]. Metaanalysen haben ergeben, dass Temozolomid mit minimaler Toxizität das Überleben verlängern und die Progression verzögern kann [73]. Ein weiterer Vorteil ist seine hohe orale Bioverfügbarkeit. Beim rezidivierenden GBM konnte mit Temozolomid jedoch kein günstiger Effekt auf die Gesamtüberlebenszeit beobachtet werden [73].

Carmustin als intravenöse Therapie war die erste chemotherapeutische Behandlung, die in Kombination mit Radiatio einen signifikanten Überlebensvorteil erbrachte [74]. Wegen der starken Nebenwirkungen kommt es heute jedoch selten zur Anwendung. Als implantierbarer Wafer kann Carmustin zur Lokalthherapie eingesetzt werden, um die systemischen Nebenwirkungen gering zu halten. Beim rezidivierenden GBM hat der Carmustin-Wafer jedoch keinen signifikanten Vorteil, insbesondere vor dem Hintergrund möglicher Komplikationen durch die Implantation wie Hirnödemen, epileptische Anfälle oder Infektionen [75]. Obwohl die Blut-Hirn-Schranke innerhalb des Tumors weniger intakt ist als im gesunden

Hirngewebe, stellt die Barriere zwischen Blut und Tumorzelle weiterhin ein Hindernis für viele Chemotherapeutika dar. Im Tumorgewebe können häufig keine suffizienten Wirkkonzentrationen erreicht werden. Darüber hinaus erlaubt die noch intakte Blut-Hirn-Schranke in der Peripherie des Tumors einen Schutz der dortigen malignen Zellen vor Chemotherapeutika.

Radiotherapie

Die fraktionierte lokale Bestrahlung hat sich als eine Therapieform herausgestellt, die das mediane Überleben von Patienten mit GBM verlängern kann [38]. Derzeit gehört sie zur Standardbehandlung von Grad III/Grad IV-Gliomen. Es wird eine Gesamtbelastung von 50-60 Gy konventioneller externer Bestrahlung in Tagesdosen von 1,8-2,0 Gy empfohlen. Das Regime sieht fünf Sitzungen pro Woche über einen Zeitraum von sechs bis sieben Wochen für die präoperative Läsion bzw. für das postoperative Tumorbett inklusive 2 cm Sicherheitsabstand vor [67]. Höhere Dosen gehen mit einem erhöhten Risiko der Schädigung gesunden Hirngewebes einher, ohne das Überleben zu verbessern [76, 77]. Dennoch können auch nach konventioneller Strahlendosis Komplikationen wie Hirnatrophie oder Enzephalopathie auftreten [78]. Ältere GBM-Patienten mit eingeschränkter Leistungsfähigkeit (Karnofsky-Index < 50) haben eine Prognose von nur wenigen Monaten. Für diese Fälle erbrachten kürzere Behandlungs-Schemata mit 30 Gy in zehn Fraktionen oder 40 Gy in 15 Fraktionen die gleichen Überlebensvorteile wie umfangreichere Behandlungen [79]. Anderen Studien zufolge profitierte diese Patientengruppe allerdings von vornherein nicht von der Radiotherapie [80].

Da die meisten Rezidive maligner Gliome innerhalb von zwei Zentimetern des Resektionsrandes auftreten [81], wurde intensiv nach Möglichkeiten gesucht, lokal höhere Strahlendosen zu erreichen und die Effizienz der Radiotherapie für maligne Gliome zu verbessern. Die sog. Hyperfraktionierung, die aus vielen, kleinen Tagesdosen mit einer hohen Gesamtdosis von 70 Gy besteht, konnte das Patientenüberleben gegenüber konventioneller Radiotherapie nicht verbessern [82]. Ebenso konnten sogenannte Strahleneskalations-Studien mit interstitieller Brachytherapie, Radiochirurgie mit Linearbeschleuniger oder Gammaknife keinen Benefit in Gesamtüberleben oder lokaler Tumorkontrolle erbringen. Vieles deutet darauf hin, dass die Radiochirurgie mit einem erhöhten Risiko für Neurotoxizität verbunden ist [83, 84]. Einige Strahlenwandler (z.B. Misonidazol, Hydroxyurea, Bromodeoxyuridin und Difluoromethylornithin) wurden zusammen mit Strahlung appliziert, konnten aber die Prognose von GBM-Patienten ebenfalls nicht signifikant verbessern [82, 85].

Die erneute Bestrahlung rezidivierender maligner Gliome wurde in nicht-randomisierten Studien untersucht. Man konnte eine Überlebensverlängerung bei relativ guter Lebensqualität beobachten. Nach vorheriger Applikation von 55-60 Gy konnten weitere 40 Gy (konventionelle Fraktionation), 35-40 Gy (fraktionierte, stereotaktische Radiotherapie) und 53 Gy (Brachytherapie) ohne inakzeptable Toxizität verabreicht werden [86–88].

1.2.5 Tumorinduzierte Neovaskularisation

Während der Transition vom anaplastischen Astrozytom (Grad III) zum Glioblastom (Grad IV) vollziehen sich dramatische vaskuläre Veränderungen innerhalb des Tumors, die sich als ringförmiges Enhancement in der Bildgebung widerspiegeln [89]. Das GBM ist stark vaskularisiert. Schon nach geringer Massenzunahme des Tumors bewirkt eine Vielzahl pro-angiogener Faktoren, dass neue Gefäßstrukturen generiert werden [90]. Diese Faktoren werden vorwiegend von Glioblastomzellen sezerniert und fungieren als Mediatoren zwischen Tumor und peritumoralem Gewebe. Interaktionspartner sind beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten oder murale Zellen der perivaskulären Nische. Eine Vielzahl dieser pro-angiogenen Faktoren konnte bereits identifiziert werden (siehe Tabelle 1.2) [89, 91]. Das potente Endothelzellmitogen VEGF wird insbesondere in der Nähe von nekrotischem Gewebe von GBM-Zellen produziert, nicht jedoch von niedrigmalignen Gliomen. Dies impliziert, dass die Progression von niedrigmalignen Astrozytomen zum GBM mit einem sog. “angiogenic switch” verbunden ist, der Veränderung der Balance zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren zugunsten der Aktivatoren [90].

Einer der Haupttrigger der Tumorangiogenese scheint in der physiologischen Antwort auf Hypoxie innerhalb des nekrotischen Milieus zu liegen. Diese induziert über HIF eine gesteigerte Transkription des VEGF-Gens in GBM-Zellen [92–94]. Als mögliche Ursache der Hypoxie werden kleine thrombosierte Gefäße diskutiert, die mittels *tissue factor* zu Mikronekrosen führen [92, 93]. Neben VEGF induziert HIF auch die Expression von Stickoxid-Synthase und Angiopoietin-2 (Ang-2). Bereits existierende Gefäße dilatieren als Antwort auf Stickoxid und ihre Permeabilität wird durch Einfluß von VEGF gesteigert. Ang-2 aktiviert schließlich Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der ECM, insbesondere MMP-2, die wiederum zur Auflösung der Basalmembran führen [95]. Die gesteigerte Permeabilität der geschädigten Gefäße führt zum Austritt von Plasmaproteinen in die ECM. Aus diesen Proteinen bildet sich eine provisorische Matrix. Endothelzellen migrieren nun durch Interaktion membranständiger Integrine mit diesen Matrixproteinen und proliferieren als Antwort auf VEGF [96]. Diese Endothelzellen stammen dabei einerseits aus lokalen Gefäßen, werden

anscheinend aber auch zu einem signifikanten Teil aus zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen rekrutiert [97,98].

Vieles weist darauf hin, dass Perizyten, die normalerweise Endothelzellen umgeben und diese stabilisieren, diesen auch als Leitschiene bei der Neovaskularisation in soliden Tumoren dienen. Dieses Phänomen wird als sog. *Sprouting* bezeichnet [99–101]. Die gebildeten Sprossen anastomosieren schließlich und formen vaskuläre Netzwerke. Stabilisiert werden diese Gefäße durch Rekrutierung muraler Zellen, also vaskulärer glatter Muskelzellen und Perizyten [96].

Die gebildeten Tumorgefäße zeichnen sich dabei durch eine Reihe pathologischer Charakteristika aus. Zunächst folgt die Organisation ihrer Verzweigungen nicht der hierarchischen Gliederung normaler Vaskularisationsarchitektur [96]. Bei der physiologischen Angiogenese gilt das Prinzip, dass keine Zelle weiter vom nächsten Gefäß entfernt ist als die Distanz, die Nährstoffe durch Diffusion überwinden können bevor sie konsumiert sind [102]. Beim GBM jedoch resultiert die fehlende Regulation des Gefäßwachstums in avaskulären, hypoxischen Gewebearealen. Auch die Struktur der Gefäßwand ist abnormal. Gefäßdiameter sind uneben, teils durch Kompression der unreifen Begrenzung durch proliferierende Tumorzellen [103], teils durch fehlerhafte Bildung des Endothels mit umfassenden Adhäsionsverbindungen an einigen und mehrschichtigen Endothelzelllagen an anderen Stellen [96]. Häufig werden die für die Stabilität der Blut-Hirn-Schranke wichtigen *Tight-Junction*-Proteine Claudin-3 und Occludin nicht mehr exprimiert [104,105]. Zusätzlich führt der Anstieg der intratumoralen VEGF-Produktion zu einer gesteigerten Endozytose des Zelladhäsionsproteins VE-Cadherin in Endothelzellen, was die Durchlässigkeit der Endothelien weiter erhöht [106,107].

Die beschriebenen Eigenschaften der Tumorgefäße können zu unterschiedlichen lokalen Hämatokritwerten, Sauerstoff-Verhältnissen und Arzneimittelkonzentrationen im Tumorgewebe, und folglich zu einer Herabsetzung der Effizienz derzeitiger substanzbasierter Therapien führen [108]. Daher besteht Interesse an der Unterbindung der tumorgetriggerten Neovaskularisation, um das Tumorwachstum einzudämmen und Begleiterscheinungen wie das Hirnödem zu minimieren.

1.2.6 Anti-angiogen ausgerichtete Therapien

Aufgrund der Limitierung konventioneller Therapien wird zunehmend nach neuen Behandlungsstrategien gesucht, die gezielter auf die Tumorbilogie des GBM eingehen und selektiv gegen Glioblastomzellen gerichtet sind. Experimentelle therapeutische Ansätze zielen

dabei auf die Bekämpfung der Tumorzellen durch selektive Beeinflussung ihrer physiologischen Eigenschaften oder Modulation ihrer Umgebung. Die tumorselektive Wirkung dieser Methoden scheint sehr aussichtsreich zu sein, allerdings fehlt noch immer der für eine standardisierte klinische Anwendung erforderliche und nur in großen Studien zu gewinnende Nachweis ihrer Wirksamkeit.

In Ansätzen wird versucht, die für das Wachstum des Glioblastoms notwendige gesteigerte Angiogenese auf molekularer Ebene zu unterbinden. Eine Möglichkeit ist hierbei die Blockade von VEGF [109, 110]. Eine Behandlung mit Bevacizumab, einem VEGF-neutralisierenden Antikörper, konnte in klinischen Studien in Kombination mit dem Topoisomerasehemmer Irinotecan die Tumorausdehnung reduzieren [111]. Neben VEGF-Antikörpern können auch kleinmolekulare Tyrosin-Kinase-Inhibitoren gegen den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR2) zur Hemmung des pro-angiogenen Signalwegs führen [112]. Andere Ansätze zielen auf die Inhibition des PDGF-Signalweges und sind in der klinischen Prüfung [113, 114]. In experimentellen murinen Gliom-Modellen konnten Antitumoreffekte durch eine Vielzahl anti-angiogener Moleküle erreicht werden, beispielsweise durch Angiostatin [115, 116], Endostatin [117, 118] und *Platelet factor-4* [119]. Ebenso führte die Kombination dieser Substanzen zu positiven Effekten [120, 121].

Die anti-angiogene Therapie des GBM mittels VEGF-Blockade wird in Studien generell gut von Patienten toleriert, obwohl häufig Nebenwirkungen in Form von arterieller Hypertension und Proteinurie auftreten. Thromboembolien und Hämorrhagien sind seltene schwerwiegende Komplikationen [122]. Mindestens die Hälfte der Patienten spricht jedoch von vornherein nicht auf diese Behandlung an, und bei Ansprechen hat sich die Wirkdauer als äußerst variabel herausgestellt [112]. Das Problem des Nicht-Ansprechens auf anti-angiogene Therapien ist eines der wesentlichen Herausforderungen auf diesem Gebiet. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht hinreichend geklärt. Möglichen Ursachen der Resistenz schließen die reaktive Hochregulation nicht-VEGF-vermittelter Signalwege der Angiogenese, vermehrte Nutzung bereits existierender Gefäße sowie die Rekrutierung und der vermehrte Einbau von supportiven Zellen wie hMSC und Perizyten in neu gebildete Kapillaren ein [112, 123].

Ansätze zur Verminderung der Therapie-Resistenz könnten darin liegen, die Wirkung anti-angiogener Substanzen durch Kombination zu potenzieren und diese im Sinne einer sog. *Multi-target*-Strategie mit toxischen Chemotherapeutika gegen proliferierende GBM-Zellen zu verabreichen. Voraussetzung hierfür ist die möglichst genaue Identifikation der Angriffspunkte und Wissen über die Rolle der Zellen, die im Tumormilieu einen möglichen

Resistenzfaktor darstellen. In dieser Arbeit soll die potenziell supportive Funktion mesenchymaler Stammzellen in Abhängigkeit GBM-sezernierter Chemokine *in-vitro* genauer beleuchtet werden. Differenzierung und Funktion dieser Zellen innerhalb des Tumormilieus könnten einen Hinweis auf deren Beitrag zur Malignität geben. Weitere Untersuchungen, insbesondere *in-vivo*, werden wichtig sein, um pathobiologische Resistenz-Faktoren zu identifizieren und das Potenzial zukünftiger, anti-angiogener Behandlungsstrategien besser auszuschöpfen.

1.2.7 Weitere experimentell therapeutische Ansätze

Immuntherapie

Bei der Immuntherapie wird versucht, das körpereigene Immunsystem gegen die Tumorzellen zu sensibilisieren und diese dann lymphozytär abzubauen. Dabei unterscheidet man die aktive und passive Immuntherapie. Zu den passiven Verfahren gehört der Einsatz sogenannter *Biological response modifiers* (BRM) wie Interferone und Interleukine (insb. IL-2), die systemisch oder intratumoral verabreicht werden können. Diese Substanzen stimulieren Lymphozyten und können in ausreichender Wirkkonzentration zu einer lokalen, immunologisch vermittelten Eindämmung des Tumorwachstums führen. Eine andere Methode ist die intratumorale Applikation von autologen Lymphozyten. Bei dieser sog. lokal adaptiven Immuntherapie werden zunächst Lymphozyten aus dem peripheren Blut gewonnen, *ex-vivo* stimuliert und daraufhin reimplantiert. Die Stimulation erfolgt hier beispielsweise durch IL-2 [124]. Eine weitere Form ist die Stimulation des Immunsystems über die Verwendung eines Antikörpers gegen Tenascin. Dieses Protein wird von Glioblastomzellen im Vergleich zum umgebenden Gewebe überexprimiert [125]. Andere Strategien beinhalten die Cytokinvermittelte Immuntherapie mit TNF- α , durch Lymphokine aktivierte Killer/LAK-Zellen und die Aktivierung T-Zell-vermittelter Antitumorimmunität durch Beimpfung dendritischer Zellen [126, 127]. Diese Technik, auch *Dendrite cell-based immunotherapy* genannt, zeigt klinische Erfolge bei Patienten mit rezidivierendem malignen Gliom in Phase I/II-Studien [128]. Zur aktiven Immuntherapie gehört die Verwendung von Tumorstoffen, die aufwendig auf der Basis patienteneigener, kultivierter Glioblastomzellen hergestellt und anschließend subkutan appliziert werden. Auch an dieser Stelle sind noch weitere Studien abzuwarten.

Immunotoxintherapie

Diese Therapieform nutzt den von normalen Zellen des ZNS abweichenden Aufbau der Tumorzell-Membran zur selektiven Bekämpfung von Gliomzellen. Durch Kopplung einer toxischen Substanz mit einem tumorspezifischen Antikörper kann ein Immunotoxin hergestellt werden. Dabei wird die inaktive Vorstufe des Komplexes nach erfolgter Bindung an die Tumorzelle aufgenommen und durch Stoffwechselprozesse aktiviert. Diese Aktivierung zieht einen zytotoxischen Effekt nach sich. Die Immunotoxintherapie wird mittels stereotaktisch implantierbarer Katheter über mehrere Tage angewendet und soll auch solche Tumorzellen erreichen, die sich als Satelliten weitab der Hauptmasse befinden [129].

Radioimmuntherapie

Die Radioimmuntherapie mit monoklonalen, ^{125}I oder ^{90}Y -gelabelten Antikörpern gegen den EGFR oder Tenascin maligner Gliomzellen zeigte antitumorale Effekte in Phase-II-Studien [130,131]. Bevor jedoch an eine Routinetherapie zu denken ist, bedarf es bei diesem Ansatz an Optimierung der Radionuklide, der Trägemoleküle und der Beförderungstechnik. Da der Antikörper in geringem Maß auch über die Blutbahn aufgenommen wird, kann es zu einer Beeinträchtigung der Knochenmarksfunktion und damit der Blutbildung und Abwehr kommen.

Gentherapie

Die Gentherapie versucht, Zielgene mit Hilfe von Vektoren selektiv in Tumorzellen einzubringen. Am häufigsten werden dazu modifizierte Viruspartikel verwendet, die sich von Retroviren ableiten. Im klinischen Bereich kommen beispielsweise Retroviren wie das *Moloney murine leukemia virus*, der *HIV-1-based lentiviral vector* oder auch Adenoviren [132] zum Einsatz, *in-vitro* ist das Spektrum eingesetzter Vektoren sehr viel größer.

Gentherapeutische Strategien für Zellen des malignen Glioms umfassten bislang Zielgene wie die *Suicide genes* (z.B. HSV-Thymidinkinase, Cytosin-Desaminase/5-fluorocytosin, Cytochrom P450 2BI/cyclophosphamid, Toxine), die Korrektur genetischer Defekte (z.B. p53, Retinoblastom, p16, MMAC1/PTEN, Fas-Ligand, Anti-EGFR), Immunmodulation (Interleukine und Interferone, $\text{TNF-}\alpha$ etc.), Exprimierung anti-angiogener Faktoren (z.B. Anti-VEGF, Angiostatin, Endostatin, *Platelet factor-4*) sowie die Kombination mehrerer Ansätze (zusammengefasst in [133]).

Trotz vielversprechender Erfolge der Gentherapie in klinischen Studien gibt es einige gra-

vierende Mängel. Zum Einen ist das Ausmaß des Gentransfers und der Genexpression bislang zu gering, weshalb oft hohe Dosen des Vektors benötigt werden. Dies wiederum erhöht die Gefahr einer Immunreaktion gegen den Vektor. Die Antikörperbildung gegen virale Vektoren kann ihre wiederholte Anwendung verhindern. Darüber hinaus muss auch die Dauer der Genexpression optimiert werden, da diese durch unspezifischen Einbau des Gens, immunologische oder entzündliche Reaktionen gegen das Genprodukt oder das Gen stark beeinträchtigt sein kann. Weiterhin birgt die Verwendung viraler Vektoren Risiken wie das Auftreten vermehrungsfähiger Vektoren, die Etablierung neuer Virusstämme oder die Neubildung eines Tumors [134].

Dies sind Gründe, warum aktuell nach neuen Vektoren gesucht wird. Dabei steht die Anwendung der zellbasierten Gentherapie zur Behandlung des Glioblastoms immer stärker im Mittelpunkt. Durch den Einsatz ortsständiger Zellen des Tumorgewebes wird versucht, Entzündungs- und Immunreaktionen gegen den Vektor zu minimieren. Gleichzeitig besteht der Anspruch an diese Vektoren, lokalspezifisch in einer ausreichenden Wirkkonzentration an der Tumorzelle anzugreifen. Derzeit beschränken sich gentherapeutische Ansätze auf zwei verschiedene Zelltypen: multipotente Stammzellen und ausdifferenzierte, postmitotische Zellen [135].

Multipotente Stammzellen gelten als realisierbar für eine zellbasierte Gentherapie. Sowohl neuronale als auch mesenchymale Stammzellen wurden als therapeutische Vektoren untersucht und zeigten vielversprechende Ergebnisse [136, 137]. Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen vorgestellt.

1.3 Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks

1.3.1 Herkunft, Phänotyp und Differenzierungspotenzial

Adulte mesenchymale Stammzellen können definiert werden als Zellen, die sich in eine Vielzahl spezialisierter, mesenchymaler Zelltypen differenzieren können, beispielsweise zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Tenozyten etc. [138]. Man bezeichnet diese Zellen auch als multipotente Stammzellen, da sich aus ihnen im Gegensatz zu totipotenten kein kompletter, lebender Organismus entwickeln kann. Aus einer pluripotenten Stammzelle hingegen können ebenfalls alle Zelllinien entstehen, jedoch nicht mehr die Trophoblasten der Plazenta. Pluripotente Stammzellen sind gleichbedeutend mit embryonalen Stammzellen (ESC), deren Potenzial für die klinische Anwendung bereits vielfach untersucht worden ist [139, 140].

Die Erforschung mesenchymaler Stammzellen geht auf die 1970er Jahre zurück, als A.J. Friedenstein et al. einen Zelltyp aus dem Knochenmark unterschiedlicher Spezies beschrieben, der nicht-hämatopoetischen Ursprungs war und adhärente, fibroblastoide Kolonien *in-vitro* formen konnte (zusammengefasst in [141]). Diese sog. *Fibroblastic colony-forming units* (CFU-Fs) zeigten in späteren Versuchen ihr Differenzierungspotenzial entlang osteogener, adipogener und chondrogener Entwicklungswege *in-vitro* und *in-vivo* [142, 143]. Humane mesenchymale Stammzellen sind in der experimentellen Forschung eine gut charakterisierte Zellpopulation. Identifiziert werden sie u.a. durch die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle wie CD 105, CD 44 und CD 49a bei gleichzeitig fehlender Nachweisbarkeit von CD 11b, CD 14, CD 31, CD 34, CD 45 und HLA-II [19, 144, 145]. Eine besondere Rolle spielen hMSC im Bereich der Gewebezüchtung zu Implantationszwecken (*Tissue engineering*), da die Entwicklung mesenchymaler Stammzellen mithilfe spezifischer Differenzierungs-Stimuli in entsprechenden Wachstumsmedien gezielt geleitet werden kann [146].

Das Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen erweist sich als immer umfangreicher. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass aus hMSC Zellen aller drei Grundgewebesichten (Ento-, Meso- und Ektoderm) generiert werden können [18]. Es gibt immer mehr Belege für Transdifferenzierung [147–149]. Wakitani et al. zeigten beispielsweise, dass hMSC, die aus dem Knochenmark von Ratten isoliert wurden, durch den Einfluß von 5-Azacytidin zu glatten Muskelzellen differenzieren [150]. Reyes et al. gelang es durch Sortieren mit magnetischen Beads und Antikörpern gegen CD 45 und Glykophorin-A mesodermale Vorläuferzellen zu isolieren, die zu Endothelzellen transdifferenzierten [19]. Diese Beispiele lassen vermuten, dass sich hMSC zu Zellen differenzieren können, die in der Gefäßneubildung eine Rolle spielen, beispielsweise bei der tumorinduzierten Neovaskularisation.

1.3.2 Potenzial als therapeutische Vektoren

Das Migrationsverhalten systemisch verabreichter hMSC macht diese zu interessanten, potenziellen Vektoren. Physiologischerweise migrieren hMSC bevorzugt in geschädigtes Gewebe [151]. Diese Fähigkeit wird mit der Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren, Chemokine und ECM-Rezeptoren der Zelloberfläche in Verbindung gebracht. Migrationsassays haben gezeigt, dass hMSC *in-vitro* durch Stimulation verschiedener Wachstumsfaktoren und Chemokine konzentrationsabhängig migrieren [12], und dass diese Migration durch das pro-inflammatorische Cytokin TNF- α stimuliert wird. In vorangegangenen Untersu-

chungen unserer Arbeitsgruppe konnte für die Faktoren VEGF-A, IL-8, TGF- β 1 und NT-3 ein jeweils stark promigratorischer Reiz auf hMSC demonstriert werden [12]. *In-vivo* zeigten hMSC einen ausgeprägten Tropismus über die Blut-Hirn-Schranke in Richtung der Glioblastomzellen, sowohl zur Hauptmasse des Tumors als auch zu disseminiert liegenden Zellen [152, 153]. Diese Eigenschaften begründen das Interesse an hMSC als zellbasierte Vektoren.

Ein weiterer Trigger der hMSC-Migration scheint von Endothelzellen auszugehen. Entzündung induziert die Aktivierung von Endothelzellen, woraufhin diese Oberflächenrezeptoren exprimieren, die eine Andockung von hMSC ermöglichen. Dies konnte für die Moleküle *Vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1/CD 106) und E-Selectin nachgewiesen werden, die Liganden der hMSC-Oberflächenproteine α 4/ β 1 und CD 44 sind [154]. Neueste Erkenntnisse legen nahe, dass PDGF-BB, das von Endothelzellen als Antwort auf VEGF sowie in hohem Maße von Glioblastomzellen exprimiert wird, die hMSC-Migration *in-vitro* und *in-vivo* triggert, und dass dieser Tropismus über den PDGF- β -Rezeptor auf hMSC vermittelt wird [96, 155].

Neben ihrem Differenzierungs- und Migrationspotenzial zeigen hMSC viele weitere Eigenschaften, die therapeutisch genutzt werden könnten. So wurde beispielsweise eine Vielzahl biologisch aktiver Moleküle identifiziert, die von hMSC sezerniert werden und wichtige parakrine Effekte modulieren. Dazu gehören trophische, immunmodulatorische und chemotaktische Substanzen (Tabelle 1.3). Die trophischen Funktionen können weiterhin unterteilt werden in anti-apoptotische, supportive (Stimulation der Proliferation und Differenzierung von organspezifischen Vorläuferzellen) und pro-angiogene. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit getestete Funktion der hMSC in Abhängigkeit des Glioblastoms soll im Folgenden kurz auf deren Kapazität zur Sekretion pro-angiogener Faktoren eingegangen werden.

1.3.3 Pro-angiogene Faktoren mesenchymaler Stammzellen

Die pro-angiogene Funktion mesenchymaler Stammzellen konnte von Kinnaird et al. in einem Mausmodell demonstriert werden. In dieser Studie wurden die Faktoren bFGF, VEGF, PlGF und MCP-1 in MSC-konditioniertem Medium nachgewiesen, sowie bFGF und VEGF im parakrinen Milieu infundierter Zellen *in-situ* nach lokaler Administration in ischämisches Gewebe [174]. In einer anderen Arbeit konnten große Mengen an pro-angiogenen und anti-apoptotischen Faktoren wie IL-6, VEGF und MCP-1 in MSC-konditioniertem Medium nachgewiesen werden. Hier inhibierten diese Faktoren den Zelltod hypoxischer Endothelzellen und förderten die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen im Tube formation

| Effekt | Molekül | Referenz |
|--------------------|------------------------|--------------------------|
| Anti-apoptotisch | VEGF | [156, 157] |
| | HGF | [156, 157] |
| | IGF-1 | [156] |
| | Stanniocalcin-1 | [158] |
| | TGF- β | [157] |
| | bFGF | [157] |
| | GM-CSF | [157] |
| Immunmodulatorisch | PGE-2 | [159–163] |
| | TGF- β | [160, 164] |
| | HGF | [164] |
| | mpCCL2 | [165] |
| | IDO | [166] |
| | iNOS | [163] |
| | HLA-G5 | [167] |
| | LIF | [168, 169] |
| Supportiv | SCF | [170, 171] |
| | LIF | [170, 171] |
| | IL-6 | [170, 171] |
| | M-CSF | [170, 171] |
| | SDF-1 | [172, 173] |
| | Angiopoietin-1 | [173] |
| Angiogen | bFGF | [174] |
| | VEGF | [174, 175] |
| | PIGF | [174] |
| | MCP-1 | [174, 175] |
| | IL-6 | [175] |
| | ECM-Moleküle | [176] |
| Chemotaxis | IL-8, SDF-1 und andere | zusammengefasst in [151] |

Tabelle 1.3: In hMSC überexprimierte Wachstumsfaktoren (Auswahl nach [177]).

assay [175].

Kürzlich konnte für einige aus Knochenmark isolierte MSC-Populationen gezeigt werden, dass sich ihre Anwesenheit *in-vitro* positiv auf die Bildung von Endothelzell-Tubes auswirkt. Die Endothelzellen wurden dabei in einem Medium inkubiert, das frei von den pro-angiogenen Faktoren VEGF-A, bFGF und IGF-1 war. In diesem Assay konnte demonstriert werden, dass MSC neben löslichen angiogenen Faktoren auch Komponenten der extrazellulären Matrix sezernieren, die als Substrat für Endothelzellen dienen und die Tube-Bildung verstärken [176].

Dies sind Beispiele, die einen Beitrag mesenchymaler Stammzellen zur Gefäßbildung innerhalb der perivaskulären Nische des GBM vermuten lassen. Um diese Hypothese zu stützen, wurden hMSC in dieser Arbeit in Abhängigkeit gliomkonditionierten Mediums auf ihren

Phänotyp und ihr pro-angiogenes Potenzial untersucht.

1.4 Auswahl der Primärantikörper

In-vivo ist eine Differenzierung der rekrutierten mesenchymalen Stammzellen innerhalb des Tumormilieus zu unterschiedlichen Zellarten möglich. Im Hinblick auf eine potenzielle Funktion der in gliomkonditioniertem Medium inkubierten hMSC (CM-hMSC) bei der Neovaskularisation wurde bei der phänotypischen Untersuchung *in-vitro* ein Schwerpunkt auf solche Marker gesetzt, die auf eine glattmuskuläre, endotheliale oder perizytäre Differenzierung hinweisen. Im Folgenden soll kurz auf die Marker eingegangen werden, gegen welche die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper gerichtet sind.

1.4.1 Endothelzellmarker

Um die Differenzierung der hMSC-Linien in eine mögliche endotheliale Richtung zu untersuchen, wurden monoklonale Primärantikörper gegen CD 151, gegen den von Willebrand-Faktor (vWF) und gegen VE-Cadherin (CD 144) verwendet. Im Folgenden soll die Auswahl dieser Antikörper kurz erläutert werden.

CD 151

Das Protein, das durch das menschliche Gen CD 151 kodiert wird, gehört zur sog. Transmembran-4 Superfamilie, deren Mitglieder größtenteils Oberflächenproteine sind. Expriert werden diese Glykoproteine vor allem von Endothelzellen, jedoch auch von Epithelien, Megakaryozyten und Thrombozyten. Sie vermitteln dort Signaltransduktionen, die eine wichtige Rolle bei der Zellbildung und -aktivierung sowie beim Zellwachstum spielen. Das Oberflächen-Glykoprotein bindet dabei an Integrine und andere Transmembranproteine aus der Superfamilie. Diese Aktivierung ist wichtig für die Zellmigration, Proliferation und Bildung neuer Blutgefäße aus Endothelzellen [178, 179].

VE-Cadherin

VE-Cadherin, auch bekannt als Cadherin-5 oder CD 144, ist ein Typ-I-Membranprotein, das zur Cadherin-Superfamilie der Ca^{2+} -abhängigen Adhäsionsmoleküle gehört. Es ist mit interzellulären Junctionen assoziiert und spielt eine wichtige Rolle bei Zellumbau

und Reifung von Endothelzellen sowie bei der Integrität von Endothelien der Blut-Hirn-Schranke [106, 107]. Als Endothelzellmarker spielt VE-Cadherin beispielsweise eine Rolle zur Abschätzung der Gefäßdichte in Gewebeschnitten [180, 181].

Von Willebrand-Faktor

Der von Willebrand-Faktor (vWF, Faktor VIII R:Ag) ist ein Plasma-Glykoprotein, das ein hochspezifisches Produkt von Endothelzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten darstellt und routinemäßig zur Identifikation von Blutgefäßen in Gewebeschnitten verwendet wird [182, 183]. Darüber hinaus wird vWF als Indikator für die Endothelzellaktivierung eingesetzt [184]. VWF vermittelt die Plättchenadhäsion an verletztem Gefäßendothel und dient als Aktivator und Stabilisator des Koagulations-Faktors VIII. Er hat funktionelle Bindungsdomänen zu Plättchen-Glykoprotein Ib, Glykoprotein IIb/IIIa, Kollagen und Heparin. Die Funktion des Glykoproteins für die Haemostase macht sich bei zahlreichen Erkrankungen wie dem Willebrand-Jürgens-Syndrom, thrombozytopenischer Purpura, Heyde's Syndrom und dem hämolytisch-urämischem Syndrom bemerkbar [183].

Der Nachweis von vWF ist auf Endothelzellen positiv [185], auf glatten Muskelzellen und Perizyten hingegen negativ [186, 187].

1.4.2 Marker glatter Muskelzellen

Für die Untersuchung auf Marker glatter Muskelzellen wurden Antikörper gegen glattmuskuläres Myosin, α -Smooth muscle actin (α -SMA) und Desmin verwendet. Die Kontraktion glatter Muskelzellen ist auf das Ineinandergleiten der Myofilamente zurückzuführen. Myofilamente werden aus Myosin und α -SMA gebildet. Zudem ist das Zytoskelett an der Kontraktion beteiligt, das sich aus Intermediärfilamenten und nicht-muskulärem Aktin zusammensetzt und sich wie ein Netz durch die Zelle zieht. Es dient den Aktin- und Myosinfilamenten als Verankerung. Im Allgemeinen sind die genannten Proteine mit Motilitätsfunktionen assoziiert. Sie sind Bestandteile vieler Zelltypen und spielen eine Rolle bei einer Reihe zellulärer Prozesse wie Fortbewegungsfähigkeit, Sekretion, Zytoplasmafluss, Phagozytose und Zytokinese.

Glattmuskuläres Myosin

Myosin gehört, ähnlich wie Aktin, zu den kontraktilen Proteinen. Diese sind hauptsächlich mit Motilitätsfunktionen assoziiert. Myosin (ca. 500 kDA) besteht aus zwei identischen

schweren Ketten (je ca. 200 kDa) und vier leichten Ketten (15-26 kDa). Der verwendete Antikörper bindet spezifisch an Polypeptide der schweren Ketten (204 und 200 kDa) und reagiert nicht mit skelettalem, kardialem oder nicht-muskulärem Myosin, sondern ist ein zuverlässiger Marker zur Identifikation glatter Muskelzellen [188]. Auf Perizyten und Endothelzellen ist dieser Marker hingegen negativ [187,188].

Muskuläres α -Aktin

Aktin ist ein globuläres (ca. 42 kDa), hoch konserviertes Protein eukaryoter Zellen und bildet die monomere Untereinheit zweier Filament-Typen: Mikrofilamente sind Hauptbestandteil des Zytoskeletts, dünne Filamente hingegen Teil des kontraktilen Apparates in Skelettmuskelzellen. Es werden drei Hauptgruppen an Aktin-Isoformen unterschieden: α -, β - und γ -Aktin. Die α -Isoform des Aktins ist dabei als Hauptbestandteil des kontraktilen Apparates spezifisch für muskuläres Gewebe, während β - und γ -Aktine bei fast allen Zelltypen als Komponente des Zytoskeletts nachzuweisen sind. Dadurch spielt Aktin eine Rolle in einer Vielzahl wichtiger Zellfunktionen wie Zellmotilität, Zellteilung und Zytokinese, intrazellulärer Bewegung von Vesikeln und Organellen, Signalübertragung sowie Etablierung und Erhalt von Zellverbindungen und Zellgestalt [189].

Der verwendete Antikörper gegen α -SMA wird häufig als Marker für eine glattmuskuläre Differenzierung verwendet, ist allerdings auch in anderen kontraktilen Zellen wie Perizyten und Myofibroblasten nachzuweisen [188,190,191].

Desmin

Desmin ist ein Typ-III Intermediärfilament, das in Sarkomeren von Skelett- und Herzmuskelzellen sowie glatten Muskelzellen zu finden ist. Es verbindet den kontraktilen Apparat der Zelle mit dem subsarkolemnalen Zytoskelett [192]. Dadurch wird die strukturelle und mechanische Integrität der Zelle aufrecht erhalten [193,194]. Vermutlich verbindet Desmin darüber hinaus Sarkomere über Desmosomen mit der extrazellulären Matrix, wodurch die Muskelkontraktion extern reguliert werden kann [194].

Desmin gehört zu den frühen Proteinmarkern bei der Entstehung von Muskelgewebe während der embryonalen Entwicklung, und ist dort bereits in den Somiten der Myoblasten nachzuweisen [192]. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen steigt die Expression von Desmin weiter an, bis es das Level von Vimentin, einem ähnlichen Intermediärfilament, übersteigt. Dies ist ein Hinweis auf den terminalen Differenzierungsstatus der Zelle.

Monoklonale Anti-Desmin-Antikörper werden beispielsweise verwendet, um in Gewebeschnitten Tumore muskulären Ursprungs wie z.B. Leiomyome oder Rhabdomyosarkome zu identifizieren [195]. Obwohl Desmin hauptsächlich der Detektion muskulärer Zellen dient, wird dieser Marker regelmäßig in Kombination mit anderen Markern zur Identifikation von Perizyten verwendet [196, 197]. Endothelzellen sind hingegen negativ für diesen Marker [187].

1.4.3 Perizytäre Marker

Perizyten innerhalb der vaskulären Nische von Glioblastomen

Durch immunhistochemische Färbungen mit endothelialen und perizytären Markern in unterschiedlichen Tumorgeweben bei Mäusen (u.a. in Gliomgewebe) konnte beobachtet werden, dass die Tumorgefäße teilweise aus endothelfreien Abschnitten gebildet wurden. Diese Gefäße waren sehr fein verzweigt, waren aktiv an der Blutzirkulation beteiligt und reagierten positiv auf den Perizyten-Marker NG2. Es wird postuliert, dass diese fein verzweigten Abschnitte von Perizyten gebildet werden und Ausdruck der frühen Neovaskularisation sind. Nach dieser Theorie nutzen Endothelzellen diese perizytären Geflechte als Leitschiene zur Bildung neuer Kapillaren [96, 99].

Blutgefäße bestehen im Wesentlichen aus Endothelzellen und muralen Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen der Gefäßwand). Perizyten haben in dieser Konstellation vielfältige Funktionen. Sie werden hauptsächlich mit der Stabilisation hämodynamischer Prozesse in Verbindung gebracht. Die Diversität ihrer Funktionen im menschlichen Körper ist jedoch weitaus größer. Im Rahmen der Vaskularisation können sie angiogene Stimuli wahrnehmen, neue endotheliale Gefäßknospen an ihren Bestimmungsort lenken und Endothelzellfunktionen modulieren [198]. Zusammen mit Endothelzellen bilden sie die kapilläre Basalmembran, die Grundlage der Blut-Hirn-Schranke [199]. Die Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen erfolgt sowohl über direkten, physischen Kontakt als auch über parakrine Signalwege. Der Zell-Zell-Kontakt untereinander scheint die Voraussetzung für deren intrinsische Aktivierung des latenten Wachstumsfaktors TGF- β zu sein, der pro-angiogen auf Endothelzellen wirkt und die Rekrutierung von hMSC aus dem Knochenmark triggert [12, 200, 201].

Da Perizyten im Allgemeinen unzureichend erforscht sind, existieren keine verlässlichen Marker für ihren spezifischen Nachweis. Dennoch konnte in den letzten Jahren eine Reihe von Markern identifiziert werden, die mit Perizyten assoziiert sind, unter anderem NG2

und Nestin.

Nestin

Nestin ist ein Typ-IV-Intermediärfilament, das zuerst in neuronalen Vorläuferzellen entdeckt wurde [202]. Nestin wird häufig als Marker früher Entwicklungsstadien neuronaler Zellen eingesetzt, wo es transient überexprimiert wird und seine höchste Konzentration in frühen Embryonalstadien erreicht [202]. In späteren Stadien der Zellentwicklung wird Nestin durch gewebespezifische Intermediärfilamente ersetzt, beispielsweise durch Neurofilamente und *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Im adulten Säugetier-ZNS wird Nestin nicht nur in Keimzellen neurogener Regionen, sondern auch in differenzierten Zellen, wie Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und Perizyten exprimiert [203]. Nestin wird meist in Kombination mit anderen Markern als perizytärer Marker verwendet [204–207]. Seine Expression in Glioblastomzellen korreliert positiv mit der Vaskularisation des Tumors [208–210]. Die Expression von Nestin in Frühstadien sich bildender vaskulärer glatter Muskelzellen scheint neuesten Erkenntnissen zufolge an PDGF-BB gekoppelt zu sein. Die Analyse zugrundeliegender Signalwege ergab, dass PDGF-BB dort einen potenten Induktor der Nestin-Expression darstellt [211].

Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 (NG2)

Proteoglykane sind Proteine, die aus Polypeptidketten und modifizierten Glykosaminoglykanen bestehen. Sie können intrazellulär, als Oberflächenproteine, in der extrazellulären Matrix oder auch als Bestandteil des perineuronalen Netzes vorkommen und haben diverse Funktionen. Innerhalb des Nervensystems spielen sie eine Rolle bei der Regulation des Wachstums, der Regeneration und Wegleitung von Axonen und agieren auch als Cofaktoren bei der Modulation anderer Migrationsprozesse im ZNS [212, 213].

NG2 (Chondroitinsulfat-Proteoglykan-4/CSPG4) ist vorrangig ein Proteoglykan des Nervensystems. Es besteht aus einem großen, membranständigen Proteoglykan mit einem Kernprotein von ca. 300 kDa und mindestens einer kovalent gebundenen Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan-Kette. Der extrazelluläre Teil des Kernproteins beinhaltet drei Abschnitte: eine N-terminale, globuläre Domäne, eine zentrale sowie eine juxtamembranöse Domäne. Im ZNS wird dieses Protein hauptsächlich auf der Zelloberfläche von sich entwickelnden sowie adulten oligodendrozytären Vorläuferzellen exprimiert, ist jedoch auch mit Chondrozyten, Cardiomyozyten, einer Reihe humaner Tumorzellen und Perizyten des zentralen Nervensystems in jeweils frühen Entwicklungsstadien assoziiert [214, 215]. NG2

interagiert mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix und mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren [216]. Es hat sich zunehmend als Perizyten-Marker etabliert und wird häufig in Kombination mit einem weiteren Marker zur Identifikation von Perizyten eingesetzt [196,205,217,218]. Auf Endothelzellen ist NG2 nicht nachgewiesen worden [219].

Kapitel 2

Methoden

Angaben zur Herkunft des in dieser Arbeit verwendeten Materials sind ausführlich im Anhang aufgeführt.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolierung und Kultivierung primärer humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Primärkulturen humaner mesenchymaler Stammzellen wurden aus Knochenmarkaspiraten adulter Spender unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit deren Einverständniserklärung angelegt. Zur Gerinnungshemmung wurden die Aspirationen mit Heparin bzw. EDTA versetzt. Tabelle 2.1 zeigt die Zusammensetzung des Wachstumsmediums für die isolierten Zellen (MEM-20%).

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|---|------------------------|
| Minimum Essential Medium Eagle (MEM), α -modifiziert | |
| 20% <i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS) | |
| 2 mM L-Glutamin, $\geq 98\%$ (TLC) | |
| 100 U/ml Penicillin | |
| 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin | alles Sigma-Aldrich, |
| 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B | Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Wachstumsmediums MEM-20% für hMSC.

Bis zu 7,5 ml des Aspirates wurden im Verhältnis 1:3 mit Medium (MEM-20%) versetzt und auf Zellsiebe der Porengröße 70 μm aufgebracht. Die Dichtegradient-Lösung Histopaque-1077 mit einer Dichte von 1,077 \pm 0,001 g/ml wurde im Verhältnis von 1:2 zur Zellsuspension in neuen Zentrifugenröhrchen bereit gestellt. Die Zelllösung wurde über mehrere Minuten verwirbelungsfrei auf den Histopaque-Dichtegradienten titriert und anschließend für 20 Minuten bei 400 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Schicht mit den mononuklearen Zellen wurde entnommen, mit 10 ml MEM-20% versetzt und erneut bei 250 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschprozess wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsvorgang und erneuter Aufnahme des Pellets in 5 ml Kulturmedium wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 2.1.7), $2\text{--}3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 Kulturfläche in einer Kulturflasche ausgesät und mit 150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ MEM-20% versorgt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator. Der erste Medienwechsel erfolgte nach mikroskopischem Adhärenz-Nachweis 48 Stunden nach Inkubationsbeginn. Anschließend wurde das Medium alle 3-4 Tage ausgetauscht. Nicht adhärent wachsende Zellen wurden beim Medienwechsel abgesaugt und so von adhärennten mesenchymalen Stammzellen getrennt.

2.1.2 Kultivierung primärer U373-Gliomzellen

Humane Glioblastomzellen der Linie U-373 wurden aus kryokonservierten Primärkulturen angesetzt. Tabelle 2.2 zeigt die Zusammensetzung des Kulturmediums für Glioblastomzellen (MEM-10%). 1 ml der 10% Dimethyl-sulfoxid- (DMSO-)haltigen Zellsuspension wurden in 10 ml MEM-10% gelöst, bei 310 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden $3\text{--}7 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 Kulturoberfläche ausgesät. 24 Stunden nach Inkubationsbeginn bei 37°C und 5% CO_2 erfolgte der erste Medienwechsel bei verifizierter Adhärenz. Daraufhin wurde das Kulturmedium alle 3-4 Tage ausgetauscht.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|---|------------------------|
| Minimum Essential Medium Eagle (MEM), α -modifiziert | |
| 10% <i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS) | |
| 2 mM L-Glutamin, $\geq 98\%$ (TLC) | |
| 100 U/ml Penicillin | |
| 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin | alles Sigma-Aldrich, |
| 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B | Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Kulturmediums MEM-10% für Glioblastomzellen.

2.1.3 Gewinnung eines tumorkonditionierten Mediums aus U373-Kulturen (CM)

Nach Erreichen der Subkonfluenz wurde das serumhaltige Medium der Glioblastomkultur durch ein serumfreies ersetzt (MEM-0%). Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung dieses Mediums.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|---|------------------------|
| Minimum Essential Medium Eagle (MEM), α -modifiziert | |
| 2 mM L-Glutamin, $\geq 98\%$ (TLC) | |
| 100 U/ml Penicillin | |
| 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin | alles Sigma-Aldrich, |
| 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B | Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Mediums MEM-0% zur Herstellung tumorkonditionierten Mediums.

Die Kulturen wurden erneut für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das serumfreie Medium mittels Vakuumpipette entnommen und bei 310 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 1 ml, 2 ml bzw. 5 ml aliquotiert und unmittelbar verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.1.4 Kultivierung primärer humaner Endothelzellen (HUVEC)

Für Kontrollversuche der Immunfluoreszenzfärbungen und des Tube formation assay wurden kryokonservierte Primärkulturen menschlicher Endothelzellen subkultiviert. Es handelte sich hierbei um die Probe einer weiblichen, kaukasischen Spenderin mit mehr als 500.000 wachstumsfähigen Zellen pro ml nach Abtau in einer 10% DMSO-haltigen Kulturlösung. Neben der Testung auf Bakterien-, Pilz-, Mykoplasmeninfektion, HIV 1/2 RNA, Hepatitis B DNA und Hepatitis C RNA wurden die Zellen nach Herstellerangaben wie folgt charakterisiert (Tabelle 2.4):

Tabelle 2.5 zeigt die Zusammensetzung des Wachstumsmediums für HUVEC-Kulturen (ECGM). Vor der Aussaat wurden Kulturflaschen mit 200 $\mu\text{l/cm}^2$ ECGM versehen und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 äquilibriert. Die Proben wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis sich 90% des Inhalts verflüssigte. Die Zellen wurden mittels steriler Pipette resuspendiert, in die Kulturflaschen eingebracht und inkubiert. Der erste Medienwechsel erfolgte nach mikroskopischem Nachweis einer Adhärenz 24 Stunden nach Inkubationsbeginn.

| Getesteter Marker | Ergebnis der Immunfluoreszenz |
|--|-------------------------------|
| CD 131 | + |
| vWF/ Faktor VIII-related antigen | + |
| Dil-Ac-LDL uptake | + |
| α -Smooth muscle actin (α -SMA) | – |

Tabelle 2.4: Charakterisierung der verwendeten HUVEC-Kultur nach Herstellerangaben.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|---|------------------------------|
| Endothelial Cell Growth Base Medium, pH 7.4, 275 mOsm/kg | |
| 0,4% ECGS/H* | |
| 2% fetales Kälberserum (FCS) | |
| 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) | |
| 1 μ g/ml Hydrocortison | alles PromoCell, Heidelberg, |
| 1 ng/ml basic Fibroblast Factor (bFGF) | Deutschland |

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Wachstumsmediums für HUVEC-Kulturen (ECGM). *Extrakt aus heparinisiertem bovinen Hypothalamus-Gewebe.

2.1.5 Kultivierung vaskulärer glatter Muskelzellen (HAoSMC)

Humane vaskuläre, glatte Muskelzellen wurden für Kontrollfärbungen bei der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Analog zu primären HUVEC wurden kryokonservierte Muskelzellen aufgetaut und in Kulturflaschen ausgesät, die zuvor mit Wachstumsmedium versehen und bei 37°C und 5% CO_2 äquilibriert wurden. Die Zusammensetzung des Wachstumsmediums für die glatten Muskelzellen ist in Tabelle 2.6 wiedergegeben.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|--|------------------------------|
| Smooth Muscle Cell Base Medium, pH 7.4 | |
| 0,05 ml/ml FCS | |
| 0,5 ng/ml EGF | |
| 2 ng/ml bFGF | alles PromoCell, Heidelberg, |
| 5 μ g/ml Insulin | Deutschland |

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Wachstumsmediums für HAoSMC-Kulturen.

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um ein Isolat aus der Tunica media einer humanen Aorta. Laut Hersteller waren diese Zellen auf virale und mikrobielle Kontamination

getestet und waren positiv hinsichtlich des Muskelzellmarkers α -Actin.

2.1.6 Passagieren von Zellen

Sowohl hMSC, Gliomzellen als auch HUVEC und HAoSMC wurden vor Erreichen der Konfluenz aus dem Zellverbund gelöst und in geringerer Zelldichte neu ausgesät (passagiert). Bei Konfluenz besteht die Gefahr, dass die Kultur nicht mehr als Monolayer wachsen kann und es aufgrund einer Kontaktinhibierung zur Beeinträchtigung des Wachstums oder bei hMSC zur spontanen Zelldifferenzierung kommt. Daher erfolgte bei 80-90% Subkonfluenz die Passagierung.

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit Hanks Balanced Salt Solution (0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH_2PO_4 , 0,35 g/l $NaHCO_3^-$, 8,0 g/l NaCl, 0,05 g/l Na_2HPO_4 , 1,0 g/l Glucose, pH 7.4) gewaschen und mit 40 μ l/cm² Kulturoberfläche einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Nach 2-3 Minuten löste sich der Zellrasen vom Boden des Kulturgefäßes ab. Gegebenenfalls wurden die restlichen Zellen nach mikroskopischem Nachweis mit einem Zellschaber manuell gelöst. Um die Trypsin-Lösung zu inaktivieren und das zytotoxische EDTA zu binden wurde die doppelte Menge an vorgewärmten MEM-20% hinzugefügt und die Lösung homogenisiert. Die Zellsuspension wurde bei 310 x g für 10 Minuten zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurden 4 x 10³ Zellen pro cm² Kulturoberfläche neu verteilt, mit Medium versorgt und inkubiert.

2.1.7 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,0025 mm² ausgezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran lebender Zellen zurückgehalten wird. Nicht vitale Zellen mit poröser Membran sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau an. Jeweils 10 μ l einer Lösung aus Zellsuspension und Trypanblau in einem Verhältnis von 1:4 wurden in die Zählkammer pipettiert und ausgezählt. Die Zellzahl der äußeren vier Quadranten wurde gemittelt und die Dichte anhand folgender Formel bestimmt:

$$\delta = m \times 5 \times 10^4$$

δ = Zellzahl/ml; m = Mittelwert aus vier Quadranten.

Die Vitalität ergab sich aus dem Verhältnis der Lebendzellzahl (ungefärbte Zellen) zur Gesamtzahl (ungefärbte und blau gefärbte Zellen).

2.1.8 Kryokonservierung von Zellen

Im Rahmen der Passagierung wurden nicht verwendete Zellen eingefroren. Die Kultur wurde vor Erreichen der Subkonfluenz mit Hanks Balanced Salt Solution gewaschen, trypsiniert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei 310 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 5 ml vorgekühltem MEM-10% resuspendiert. Aus DMSO und MEM-10% wurde in einem Verhältnis von 1:4 ein Einfriermedium hergestellt. Je 500 μ l Zellsuspension und 500 μ l Einfriermedium wurden in Cryo-Röhrchen homogenisiert, sodass eine Endkonzentration von 10% DMSO erreicht wurde, um eine Zellwand-schädigende Kristallisierung zu vermeiden. Die Aliquots wurden über Nacht im Cryo-Einfriergerät langsam heruntergekühlt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2 Fluorescence Activated Cell Sorting-Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ist die am häufigsten verwendete Methode der Immunphänotypisierung. Dabei wird die Expression verschiedener Antigene auf der Oberfläche von Zellen analysiert. Hiermit lassen sich Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit der untersuchten Zellen zu einer bestimmten Zellreihe machen.

Um sicherzustellen, dass mit der oben beschriebenen Isolierungsmethode mittels Ficoll-Dichtegradient die gewünschten hMSC gewonnen werden konnten, wurde an drei verschiedenen Proben eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst gelöst und ausgezählt. Anschließend wurde eine Zellsuspension der Konzentration 2×10^5 Zellen/200 μ l hergestellt. Die Aliquots wurden für zwanzig Minuten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (anti-CD 11b, anti-CD 14, anti-CD 31, anti-CD 34, anti-CD 44 und anti-CD 105) auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreifach mit PBS gewaschen. Die Analyse der fixierten Zellen erfolgte mit einem FACScan Flow Cytometer. Die Daten aus 100 000 Ereignissen wurden unter Verwendung der Cell Quest Software analysiert.

2.3 Immunologische Fluoreszenz-Färbungen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde bei mesenchymalen Stammzellen das Auftreten von spezifischen Markern in Abhängigkeit von gliomkonditioniertem Medium untersucht. Die Färbung basiert auf der Antigen-Antikörper-Bindung. Es wurden zwei Arten von Antikörpern verwendet: der Primärantikörper ist gegen das spezifische Antigen gerichtet. Ein Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, macht das Vorhandensein des Antigens unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die Zellen wurden jeweils in Kulturflaschen mit unterschiedlichem Verhältnis von Nährmedium zu gliomkonditioniertem Medium (CM) ausgesät und zwei Wochen lang inkubiert. Die Versorgung der Zellen mit gliomkonditioniertem Medium folgte dabei einem Schema absteigender Konzentrationen: es wurden fünf CM-Konzentrationsstufen (100-20% CM) sowie eine serumfreie (MEM-0%) und serumhaltige Kontrolle (MEM-20%) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Erreichen der Subkonfluenz inkubiert. Der Medienwechsel erfolgte dabei alle 48 Stunden.

Anschließend wurden die Kulturen trypsiniert, in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 310 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 1 ml MEM-20% resuspendiert. Die Vitalität wurde überprüft und anhand der Zellzahl eine Verdünnung hergestellt, die zwischen 6 und 8 x 10⁴ Zellen/ml MEM-20% enthielten. Jedes Well eines 8-well-Chamberslides wurde mit 2 µl der Zellsuspension beimpft. Direkt anschließend erfolgte die Versorgung der Zellen mit Nährmedium nach oben beschriebenem Schema. Zusätzlich wurde pro getestetem Antikörper ein Kontroll-well angelegt, um die Qualität der Färbung beurteilen zu können. Hier wurde kein Primärantikörper verwendet.

Nach 24 Stunden wurden die Medien aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS, pH 7.2) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4% Formaldehydlösung (PFA-4%, 40 g/l Paraformaldehydpuder, 50 µl/l 2 N NaOH, 100ml/l 10 x PBS) fixiert und 20 Minuten bei 4°C gekühlt. Währenddessen wurde die *Blocking solution* hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2.7 dargestellt ist.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|---|--|
| 3% Triton X-100 1:10 in dH ₂ O | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| 10% Normal Goat Serum (NGS) | Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK |
| 87% PBS 1:10 in dH ₂ O | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der *Blocking solution*.

Nach dreifacher Waschung mit PBS für jeweils drei Minuten wurden die Zellen für 60 Minuten bei RT mit der *Blocking solution* bedeckt. Die Kultur wurde erneut zwei Mal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Primärantikörper-Lösung hinzugefügt (Tabelle 2.9). Dazu wurden Antikörper gegen spezifische Marker glatter Muskelzellen, Endothelzellen und Perizyten verwendet (Tabelle 2.8).

| Zielzelle | Primärantikörper, Typ | Herkunft |
|--------------------|---|---|
| glatte Muskelzelle | Anti- α -Smooth muscle actin, Maus | RnD Systems, USA |
| | Anti-Desmin, Maus | Sigma, Saint Louis, USA |
| | Anti-Myosin (Smooth), Maus | Sigma, Saint Louis, USA |
| Endothelzelle | Anti-von Willebrand Faktor, Hase | Sigma, Saint Louis, USA |
| | Anti-VE-Cadherin, Maus | RnD Systems, Inc., USA |
| | Anti-CD 155, Maus | RnD Systems, Inc., USA |
| Perizyt | Anti-NG2, Maus | Sigma, Saint Louis, USA |
| | Anti-Nestin, Hase | Chemicon International, Billerica, USA |

Tabelle 2.8: Verwendete Primärantikörper.

| Inhaltsstoff | Herkunft |
|--|---------------------------------------|
| Antikörper-Stock (Ak-Stock) je nach Verdünnung zwischen 0,1- 2,5% | |
| 10% NGS | Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK |
| 87,5-89,9% PBS 1:10 in dH_2O je nach Verdünnung des Ak-Stocks | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Primärantikörper-Lösung.

Die Chamberslides wurden abgedeckt für zwei Stunden bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend mit der Sekundärantikörper-Lösung für 30 Minuten bei RT zusammen gebracht. Diese war zusammengesetzt aus 0,5% Rhodamin-isothiocyanat-(TRITC-)Anti-Maus-Ak bzw. Fluorescein-isothiocyanat-(FITC-)Anti-Hase-Ak (je nach Herkunft des Primärantikörpers), 10% NGS und 89,5% PBS 1:10 in dH_2O . Im Anschluss wurden die Wells wieder drei Mal gewaschen. Nun wurden die Zellkerne mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 in PBS für 5 Minuten bei RT angefärbt. Der Farbstoff wurde mit PBS und zwei Mal mit dH_2O ausgewaschen und das Gestell des Chamberslides vom Objektträger gelöst, sodass die Flüssigkeit konfluierte. Nach Zugabe von 2

ggt Fluorescent Mounting Medium und Fixierung der Deckgläser mit Klarlack konnte die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Die Zellen wurden mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskop untersucht, digital fotografiert und mithilfe der Analyse-Software ausgewertet (Axio-Vision, Zeiss). Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung unter Verwendung vier verschiedener hMSC-Linien der zweiten und dritten Passage durchgeführt.

2.4 Matrigel Tube Formation Assay

Um die Bildung 3D-tubulärer Strukturen von hMSC und Endothelzellen in Abhängigkeit von tumorkonditioniertem Medium vergleichen zu können, wurden die Zellen in verschiedenen Medien inkubiert und auf ein Gel aufgebracht, das eine komplexe extrazelluläre Matrix nachbildet (Matrigel). Dieses Gel besteht aus einem gallertigen Proteinmix, der von Engelbreth-Hol-Swarm-Tumorzellen der Maus produziert wird. Es bildet die Grundlage für eine dreidimensionale Migration der Zellen und die Bildung tubulärer Netzwerke.

Die Tube-Bildung von hMSC und HUVEC in An- und Abwesenheit von CM (100-20%), MEM-20% bzw. ECGM und MEM-0% wurden zunächst entsprechende Kulturen bis zur Subkonfluenz angelegt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 400 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 1 ml des Mediums resuspendiert, in dem die Kultur zuvor inkubiert wurde. Die Vitalität wurde überprüft und anhand der Zellzahl eine Verdünnung hergestellt, die $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium enthielt. Das Matrigel (ECM-Gel) wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. Pipettenspitzen, 96-Well-Platten und Eppendorf-Tubes wurden auf -20°C heruntergekühlt, da das ECM-Gel bei RT polymerisiert. Auf Eis wurden 50 μ l ECM-Gel pro Well auf eine 96-well-Platte pipettiert und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um das Gel fest werden zu lassen. Je 150 μ l der Zellsuspensionen wurden in absteigender Konzentration des tumorkonditionierten Mediums (100-20% CM) sowie mit MEM-20%/ECGM und MEM-0% aufgetragen und inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen fluoreszierend angefärbt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Wells wurden mit je 100 μ l Färbepuffer (PBS, 2% FBS, 2% Natriumacetat) gewaschen und anschließend mit 50 μ l/Well Färbelösung (1 μ M Calcein AM in DMSO) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde anschließend drei Mal mit 100 μ l

PBS/Well gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Auswertung erfolgte durch Analyse ringförmiger, geschlossener kapillarähnlicher Strukturen (Tubes) pro Well, deren interzellulärer Verknüpfungspunkte (Branching points) pro Well sowie der Länge der gebildeten Tubes mittels Axio-Vision-Software (Zeiss, Deutschland). Der Auswertung liegen drei Experimente mit insgesamt drei verschiedenen hMSC-Linien der zweiten und dritten Passage sowie einer primären HUVEC-Kultur zugrunde, und die Daten für jedes getestete Medium entstammen aus acht separaten Wells.

2.5 Statistik

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Assays wurde der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl pro Well ermittelt, wobei eine mittlere Zelldichte von $7,72 \times 10^4$ Zellen/ml in den Wells erreicht wurde. Die Quantifizierung des Tubes Formation Assays erfolgte durch Identifikation der Tubes $> 15 \mu\text{m}$, der Branching points innerhalb zirkulär geschlossener Strukturen sowie der mittleren Länge der Tubes pro Well. Daten aus hMSC- und HUVEC-Assays in 20-100% CM sowie in den Kontrollmedien wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Die statistische Signifikanz der Daten wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit dem Tukey's HSD-Test als post-hoc-Verfahren ermittelt. Der Student's T-Test wurde in Kombination mit Bonferroni's Alpha-Korrektur verwendet, um einzelne Vergleiche zwischen hMSC und HUVEC-Daten im Tube Formation Assay zu analysieren. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde bei allen Verfahren als "statistisch signifikant" betrachtet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der hMSC

3.1.1 Ergebnisse der FACS-Analyse

Die für die folgenden Versuche verwendeten, aus Knochenmark isolierten, mononukleären Zellen wurden zunächst als mesenchymale Stammzellen identifiziert. Hierfür wurde eine phänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) durchgeführt. Unsere Arbeitsgruppe analysierte insgesamt drei Spenderproben, dessen Stammzellen nach dem oben beschriebenen Protokoll isoliert wurden. hMSC werden hier als mononukleäre Zellen definiert, die folgende Kriterien aufweisen:

- Sie sind positiv für die Oberflächenmarker CD 105 und CD 44, während sie für andere Marker mononukleärer Zelltypen des Knochenmarkes wie CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ sind.
- In Zellkultur haben sie eine typische fibroblastenartige Morphologie, wachsen adhärent an Kulturflaschenböden und zeigen, anders als beispielsweise Endothelzellen, eine Proliferation unter FBS-Supplementierung.

Mit der beschriebenen Methode zur Isolierung von Zellen mittels Ficoll-Dichtegradient werden mononukleäre Zellen gewonnen, die neben den hMSC eine hMSC-ähnliche Morphologie und Funktion aufweisen können. Deshalb ist es notwendig, die isolierten Zellen als hMSC zu charakterisieren. CD 34 wird auf hämatopoetischen Stammzellen (HSC) exprimiert, CD 11b auf Makrophagen und Monozyten, CD 14 auf Monozyten und CD 31 auf Endothelzellen.

Die Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse. Es konnten positive Ergebnisse für die Marker CD 105 (99%) und CD 44 (95%) erzielt werden, während sie für CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ waren.

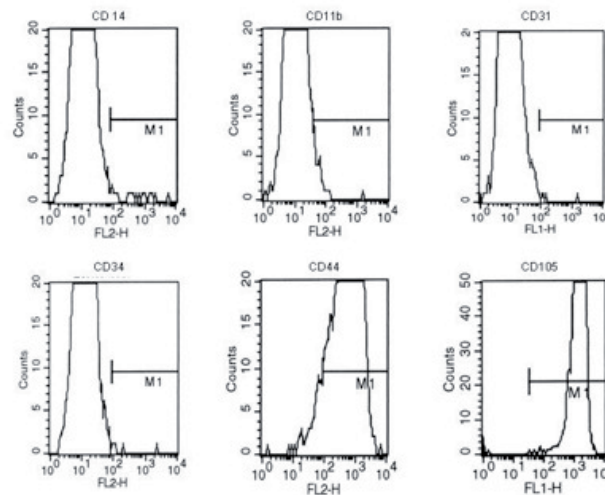


Abbildung 3.1: Ergebnisse der FACS-Analyse isolierter Stammzellen aus humanem Knochenmark. Die untersuchten Zellen waren positiv für die Oberflächenmarker CD 44 und CD 105, während sie für CD 14, CD 11b, CD 31 und CD 34 negativ waren. $n = 3$.

3.1.2 Kulturverlauf isolierter hMSC in Standardmedium (MEM-20%)

Ein wesentlicher Bestandteil der Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen ist der Dichtegradient der Histopaque-1077-Lösung. Dieser dient dazu, einen großen Teil der Blutzellen des Knochenmarks, wie Erythrozyten, einleitend zu entfernen. Initial wurden $2-3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 aus der Gradientenfraction der oberen Phase ausgesät. Nach 48 Stunden erfolgte der erste Medienwechsel, der mit der Entfernung nicht adhärent wachsender Zellen verbunden war.

Lichtmikroskopisch waren erste adhärent wachsende mesenchymale Stammzellen nach ein bis drei Tagen zu erkennen. Diese lagen meist als individuelle, spindelförmig fibroblastoide Zellen vor (Abb. 3.2, B). Daneben waren noch nicht adhärente, runde sowie einige scheinbar locker an der Kulturoberfläche anhaftende Zellen zu erkennen. Pro 10^6 ausgesäte Zellen entwickelten sich im späteren Kulturverlauf durchschnittlich 1-3 Kolonien humaner

3.2 Abhängigkeit der hMSC-Morphologie von gliomkonditioniertem Medium 39

MSC aus Primärzellen mit typischer Varianz der Zellzahl (Abb. 3.2, C). Nach 16-21 Tagen wuchsen die ersten Kolonien zu etwa 80-90% konfluent (Abb. 3.2, D-F).

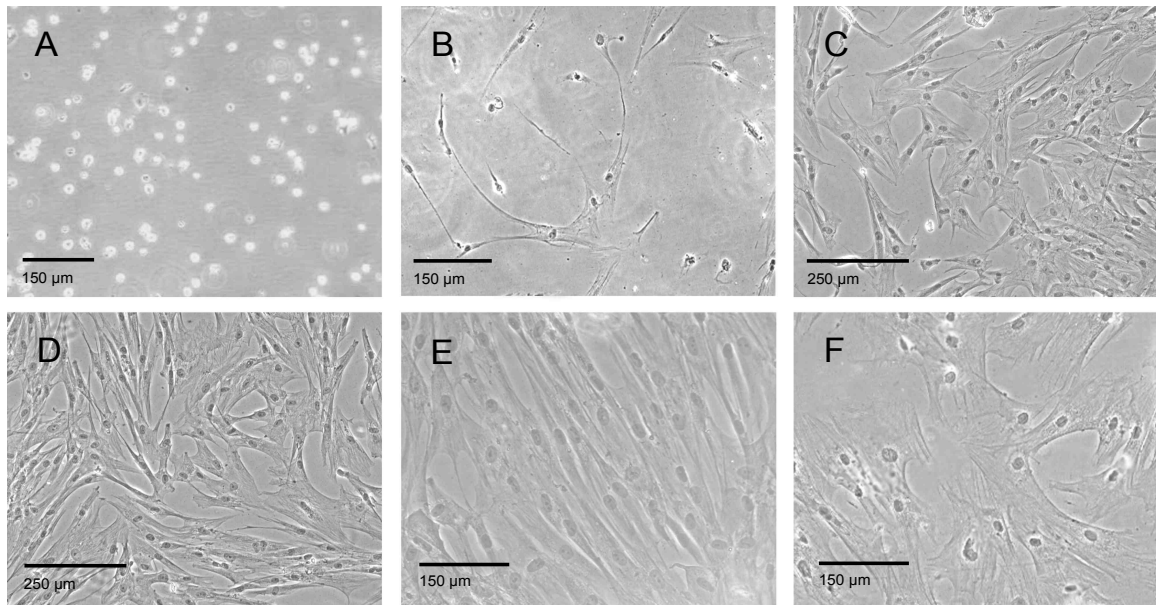


Abbildung 3.2: Repräsentativer Kulturverlauf primärer hMSC in MEM-20%. (A) am Tag 3, (B) am Tag 7, (C) am Tag 14, (D) am Tag 17. Subkonfluentes Wachstum wurde in der Regel zwischen 16 und 21 Tagen Inkubation in serumhaltigen Medien erreicht. (E) fibroblastoide und (F) großzellige, flächige Morphologie bei hMSC der 2. Passage am jeweils 17. Inkubationstag.

Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Passagierung mit erneuter Aussaat der Zellen in einer Dichte von 6×10^3 hMSC/cm². In den meisten Kulturen blieb das Erscheinungsbild auch in den höheren Passagen fibroblastoid (Abb. 3.2, E), einige Zellen erschienen aber auch breit und flächig (Abb. 3.2, F). Für die Färbungen und den Tube Formation Assay wurden ausschließlich Zellen der zweiten und dritten Passage verwendet.

3.2 Abhängigkeit der hMSC-Morphologie von gliomkonditioniertem Medium

Um die Differenzierung gliomkonditionierter hMSC sowohl morphologisch als auch durch Immunphänotypisierung zu untersuchen, wurden die isolierten Zellen der zweiten Passage zunächst mit einer Dichte von 6×10^3 hMSC/cm² in Kulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen der Subkonfluenz in Medien unterschiedlicher Zusammensetzung inkubiert: 100, 80, 60, 40 und 20% U373-konditioniertes Medium (CM), Standardmedium (MEM-

3.2 Abhängigkeit der hMSC-Morphologie von gliomkonditioniertem Medium40

20%, Kontrolle zur CM-Konzentrationsreihe) sowie serumfreies Kontrollmedium (MEM-0%, Kontrolle zu 100%-CM).

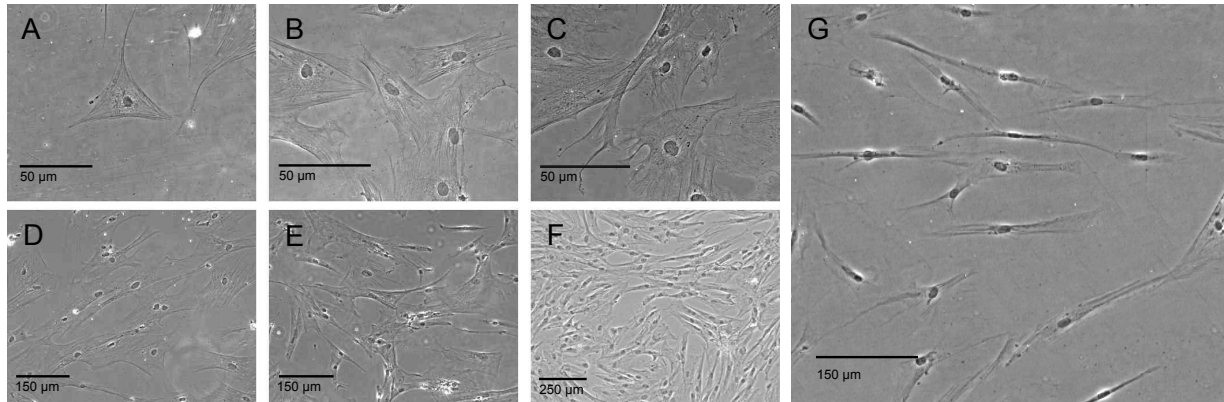


Abbildung 3.3: hMSC-Morphologie in Abhängigkeit von CM. hMSC der zweiten Passage zeigten je nach CM-Konzentration eine charakteristische Morphologie: flächige Zellen mit großem Zellkern und zytoplasmatischen Fortsätzen in den hohen CM-Konzentrationsstufen (A-C), fibroblastoide Morphologie in den niedrigeren CM-Konzentrationsstufen und in MEM-20% (D-F), spindelförmige Zellen in MEM-0% (G). A = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20%, F = MEM-20%, G = MEM-0%.

Der Kulturverlauf der Zellen wurde bis zum Erreichen der Subkonfluenz lichtmikroskopisch untersucht und dokumentiert (vierfacher Ansatz). Abb. 3.3 zeigt hMSC der zweiten Passage 14 Tage nach Inkubation in CM der beschriebenen Konzentrationsreihe (Abb. 3.3, A-E), in MEM-20% (Abb. 3.3, F) und in MEM-0% (Abb. 3.3, G).

Die kultivierten hMSC zeigten dabei je nach CM-Konzentrationsstufe unterschiedliche morphologische Eigenschaften. Während in serumhaltigem MEM-20% inkubierte Zellen weitgehend ihre unspezifische fibroblastoide Form mit häufig kurzen zytoplasmatischen Ausläufern behielten (Abb. 3.3, F), zeigte sich in den hohen CM-Konzentrationen eine zunehmende Verbreiterung der Zellen mit Vergrößerung des Zellkerns und häufig Ausbildung eines bis zwei langer, zytoplasmatischer Fortsätze (100-60% CM, Abb. 3.3, A-C). Des weiteren lagen die Zellen oftmals isoliert vor. Mesenchymale Stammzellen aus serumfreiem MEM-0% wurden, ebenso wie die in 60, 80 und 100% CM inkubierten Zellen, nach 16 Tagen nicht konfluent. Ihr Zytoplasma war vergleichsweise vermindert und die Zellen nahmen eine spindelförmige Gestalt mit kleinem Zellkern an (Abb. 3.3, G).

3.3 Immunologische Phänotypisierung der hMSC in Abhängigkeit von gliomkonditioniertem Medium

Mittels indirekter Immunfluoreszenz kann die Exprimierung spezifischer Antigene auf den Zelloberflächen der hMSC-Linien sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden acht spezifische Primärantikörper eingesetzt, die in ihrer Konstellation auf eine Differenzierung zu glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Perizyten hinweisen. Die Färbung erfolgte in einem zweiten Schritt mittels fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (TRITC-Anti-mouse-Ak bzw. FITC-Anti-rabbit-Ak). Bei der Negativprobe wurde auf den Primärantikörper verzichtet.

Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz zeigten, dass native hMSC, die in serumfreiem Medium inkubiert wurden (MEM-0%), von allen getesteten Markern nur den Perizyten- und Stammzellmarker Nestin exprimierten (Tabelle 3.1). Serumhaltiges Wachstumsmedium (MEM-20%) führte hingegen zu einer schwachen Reaktion auf α -SMA, wobei keine weiterer Nachweis von Nestin erbracht werden konnte.

| assoziierter Zelltyp | Marker | 100% CM | MEM-20% | MEM-0% |
|----------------------|-----------------|---------|---------|--------|
| glatte Muskelzellen | α -SMA | +++ | + | – |
| | Desmin | ++++ | – | – |
| | Myosin (smooth) | – | – | – |
| Endothelzellen | CD 151 | +++ | – | – |
| | vWF | – | – | – |
| | VE-Cadherin | ++ | – | – |
| Perizyten | Nestin | +++ | – | + |
| | NG2 | ++++ | – | – |

Tabelle 3.1: Ergebnis der Fluoreszenzintensität (FI) auf hMSC für die getesteten Marker in CM, MEM-20% und MEM-0%. FI wurde dabei wie folgt definiert: ++++ = >75%; +++ = 50-75%; ++ = 25-49%; + = 1-24% Anteil fluoreszierender Zellen an allen Zellen pro Well. – = keine sichtbare Fluoreszenz.

Tumorkonditionierte hMSC hingegen zeigten den Nachweis der Muskelzellmarker α -SMA und Desmin (Abb. 3.5 und Abb. 3.6), der Endothelzellmarker CD 151 und VE-Cadherin (Abb. 3.8 und Abb. 3.10) sowie der Perizytenmarker Nestin und NG2 (Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

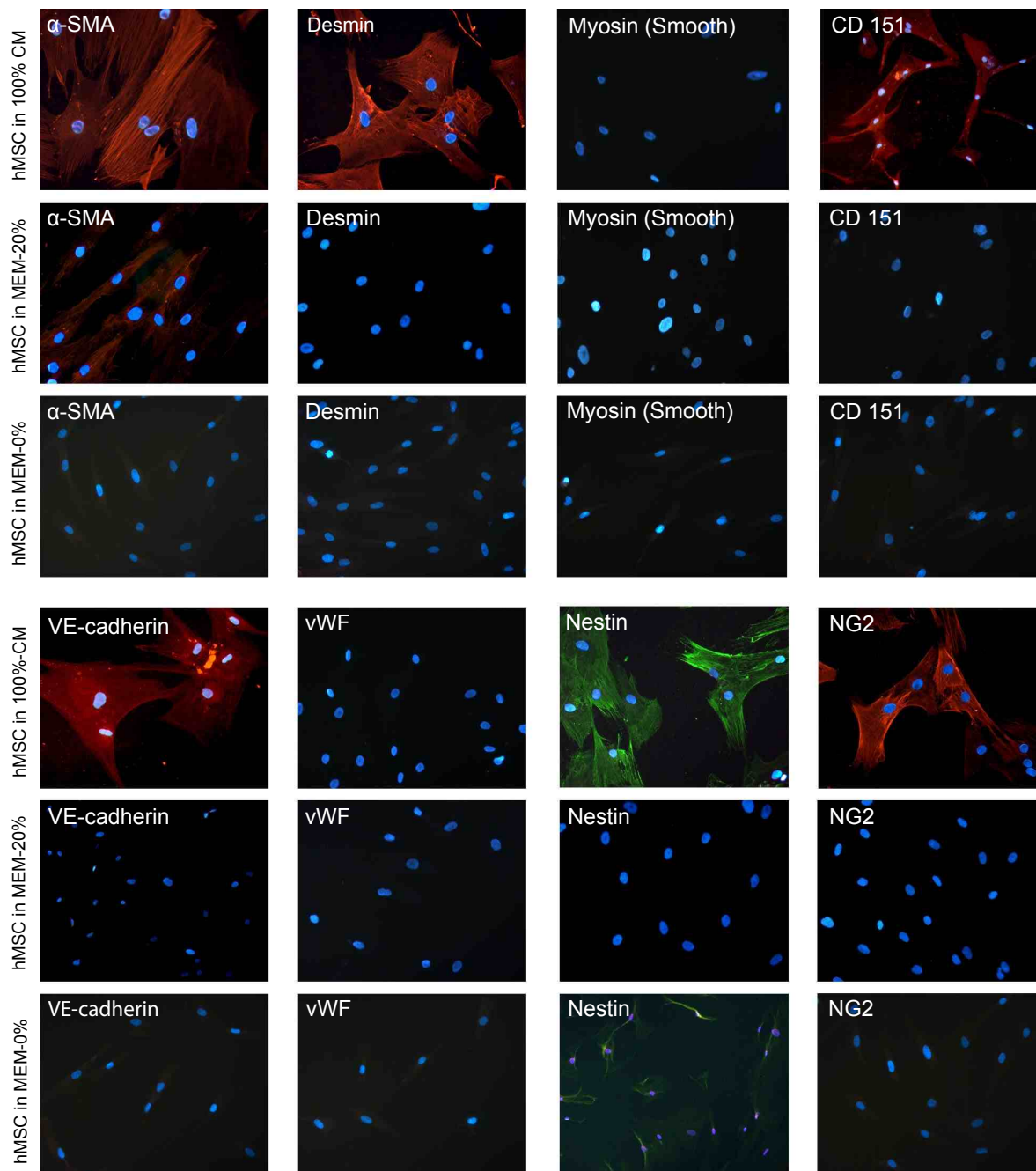


Abbildung 3.4: Gegenüberstellung der fluoreszenzmarkierten hMSC, die in 100% CM, in MEM-20% und in MEM-0% inkubiert wurden als Übersicht für alle getesteten Marker (α -SMA, Desmin, Myosin, CD 151, VE-Cadherin, vWF, Nestin, NG2). In nicht-konditioniertem, serumfreien Medium (MEM-0%) waren hMSC positiv für den Stammzellmarker Nestin. In nicht-konditioniertem, aber serumhaltigen Medium (MEM-20%) zeigten hMSC den Nachweis des Muskelzellmarkers α -SMA, wobei alle anderen Marker negativ waren. In tumorkonditioniertem Medium hingegen (100% CM) exprimierten hMSC neben α -SMA auch Desmin, CD 151, VE-Cadherin, Nestin und NG2. Glattmuskuläres Myosin und vWF konnten nicht nachgewiesen werden. Vergrößerung: x 350-400.

Für die Antikörper gegen den Von-Willebrand Faktor (vWF, Abb. 3.9) und das glatt-muskuläre Myosin (Abb. 3.7) konnte hingegen keine Fluoreszenz beobachtet werden. Die Validität dieser Primärantikörper wurde durch Färbung humaner Endothelzellen (HUVEC) und vaskulärer glatter Muskelzellen (HAoSMC) nach oben beschriebenem Protokoll bestätigt. Eine Übersicht über die Fluoreszenzergebnisse zeigen Abb. 3.4 und Tabelle 3.1.

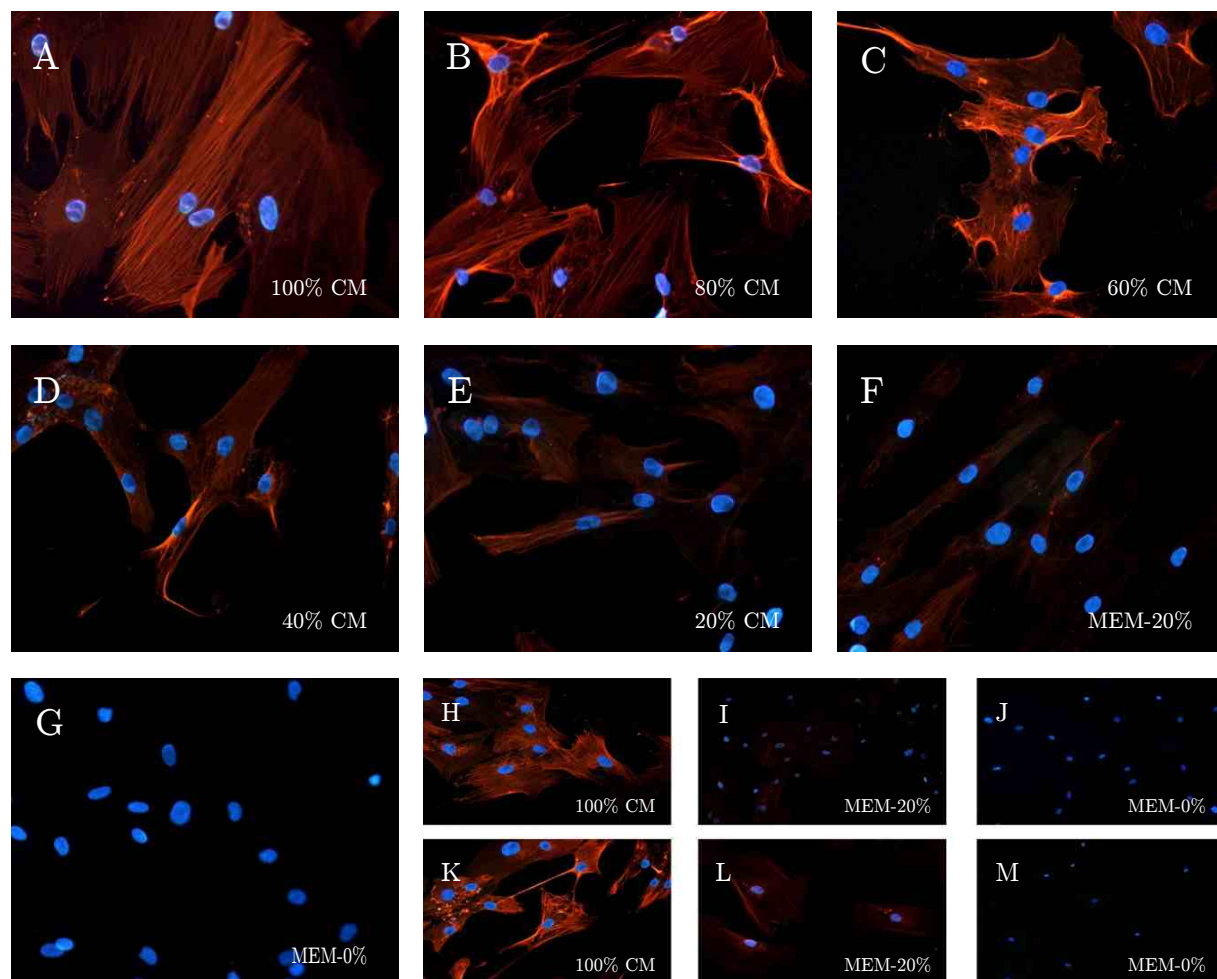


Abbildung 3.5: α -SMA-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von α -SMA in hMSC aus drei verschiedenen Linien. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. Illustriert wird hier die konzentrationsabhängige Expression von α -SMA in in Anwesenheit von tumorkonditioniertem Medium. In Abwesenheit von CM war α -SMA in serumhaltigem Medium (MEM-20%) positiv, in serumfreiem (MEM-0%) hingegen negativ. 300-400fache Vergrößerung.

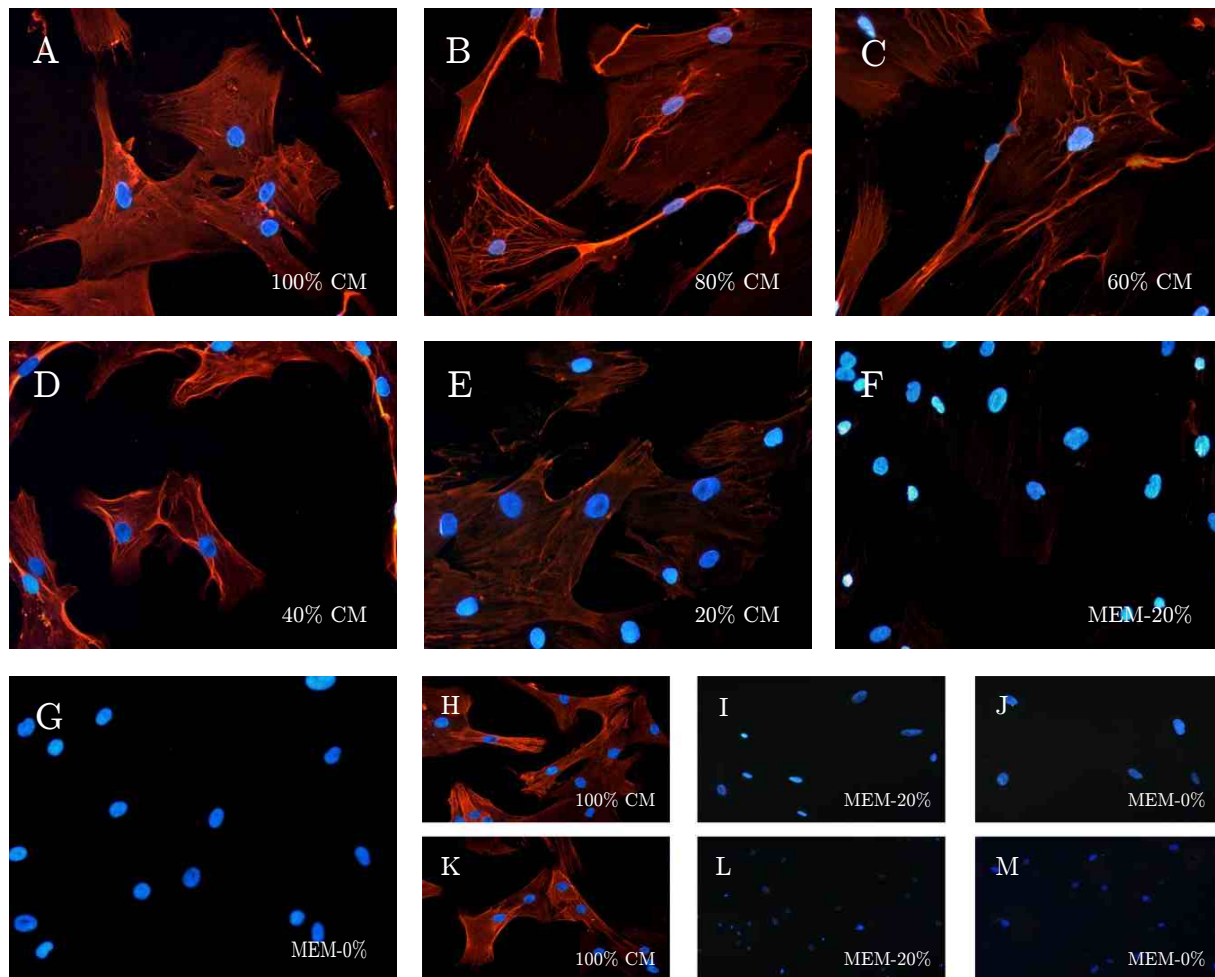


Abbildung 3.6: Desmin-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von Desmin mittels Immunfluoreszenz in hMSC aus drei verschiedenen Linien. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. Desmin wurde besonders stark in hohen CM-Konzentrationen nachgewiesen (A, B). Sowohl in MEM-20% als auch in MEM-0% war Desmin auf hMSC hingegen nicht nachzuweisen. 300-400fache Vergrößerung.

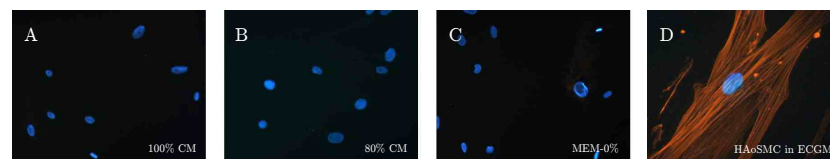


Abbildung 3.7: Myosin-Fluoreszenzfärbung. Myosin konnte auf hMSC weder in gliomkonditioniertem Medium (20-100% CM), in MEM-20% noch in MEM-0% detektiert werden (A–C). Um die Validität des Antikörpers zu bestätigen, wurden humane glatte Muskelzellen (HAoSMC) nach oben beschriebenen Protokoll gefärbt (D). 300-400fache Vergrößerung.

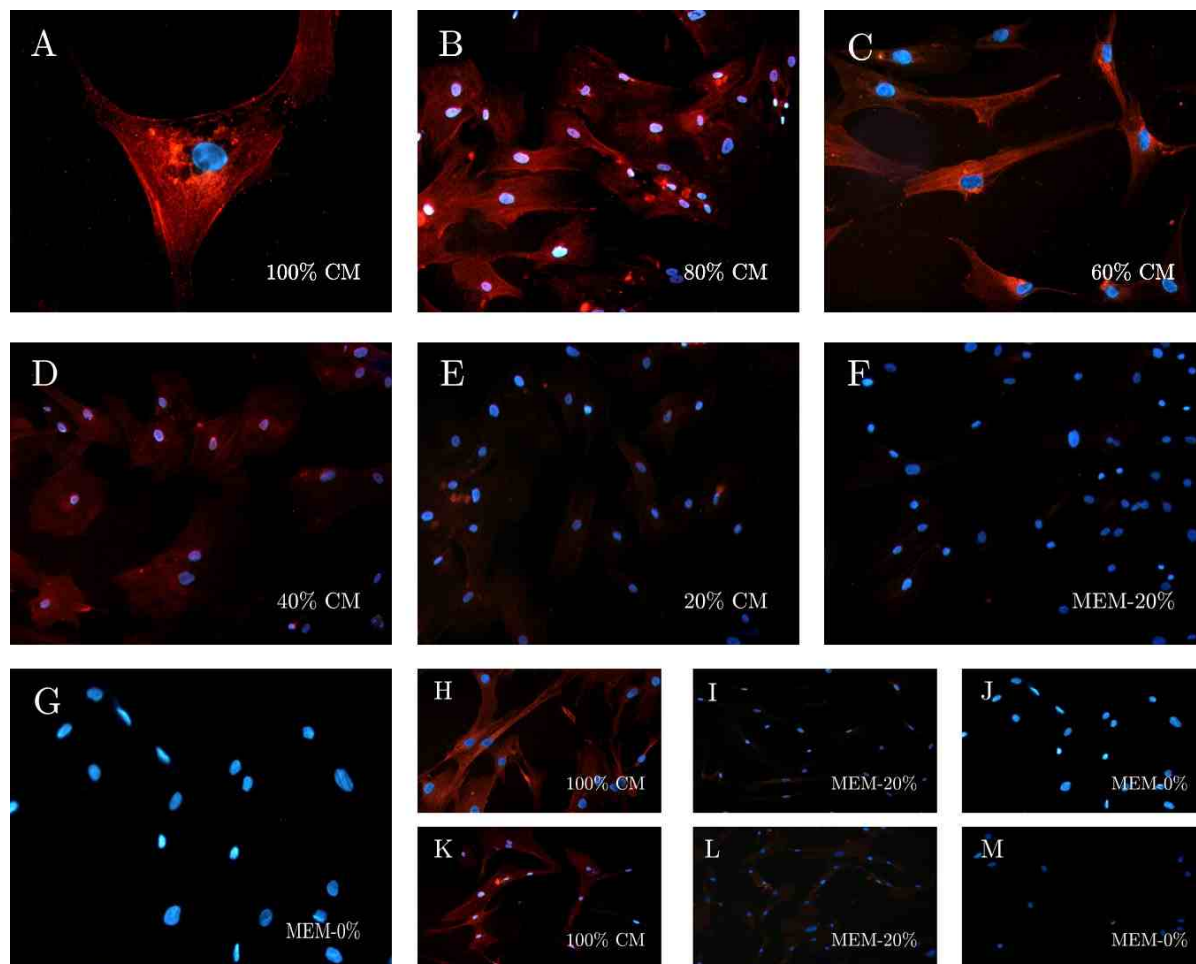


Abbildung 3.8: CD 151-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von CD 151 in hMSC aus drei verschiedenen Linien mittels Immunfluoreszenz. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. Die höchste Intensität der Fluoreszenz konnte hier für 100% CM beobachtet werden (A, H, K). Diese schwächte sich jedoch mit abnehmender CM-Konzentration ab und war schließlich in Abwesenheit von CM nicht mehr nachzuweisen (F, G).

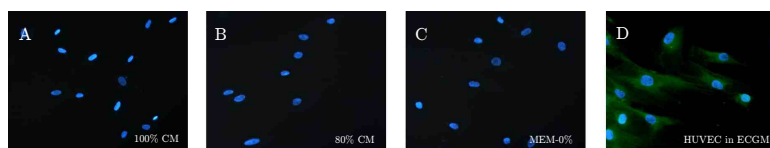


Abbildung 3.9: vWF-Fluoreszenzfärbung. Die Antikörperfärbung erbrachte keinen Hinweis auf die Expressierung von vWF auf hMSC (hier hMSC der zweiten Passage), weder in tumorkonditioniertem (100% CM, A), in MEM-20% (B), noch in MEM-0% (C). Die Positivkontrolle mit HUVEC bestätigte die Validität des verwendeten Anti-vWF-Primärantikörper (D–F).

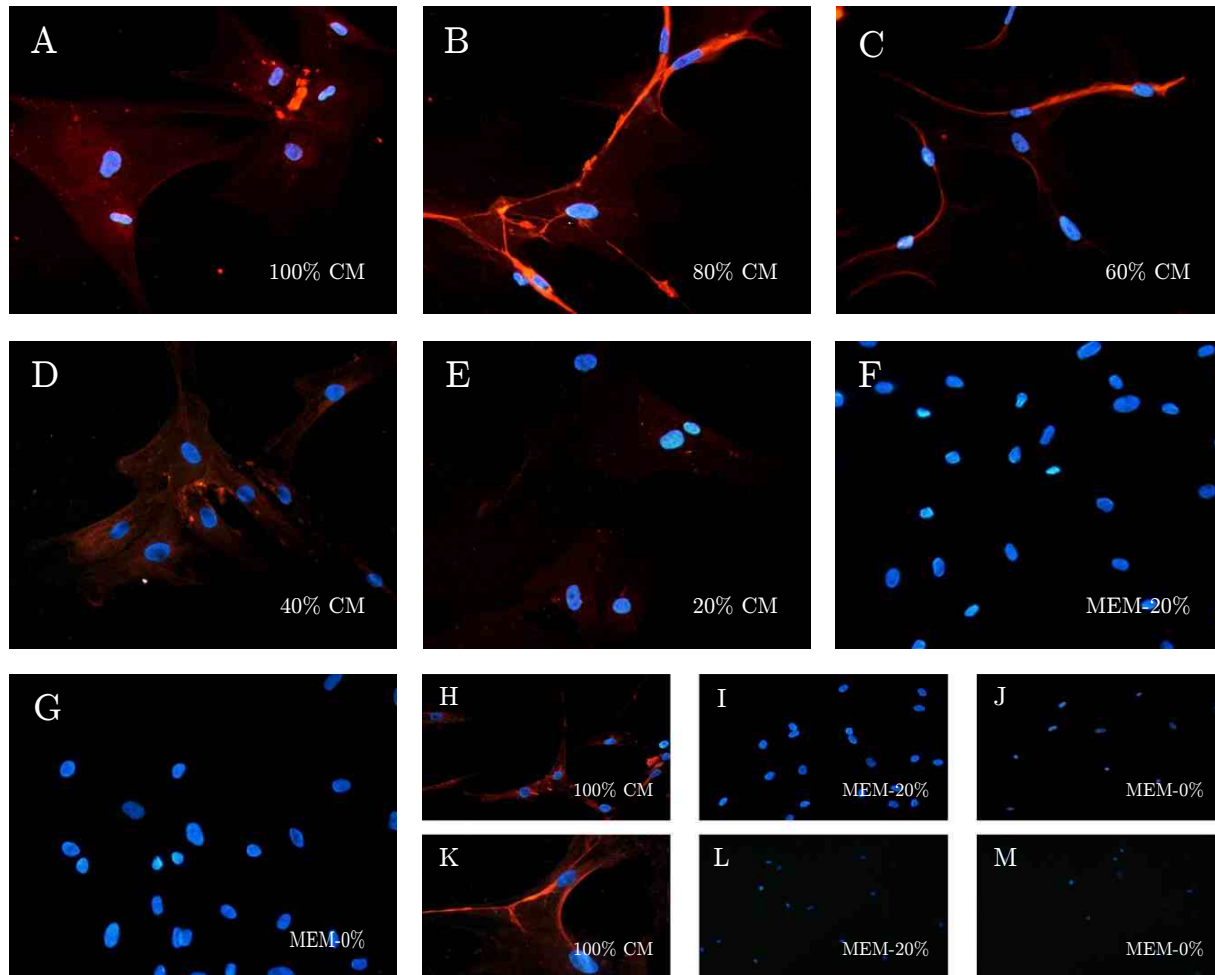


Abbildung 3.10: VE-Cadherin-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von VE-Cadherin in hMSC aus drei verschiedenen Linien mittels indirekter Immunfluoreszenz. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. VE-Cadherin konnte auf allen getesteten hMSC-Linien, die in gliomkonditioniertem Medium inkubiert wurden, als Zellrand betonte Fluoreszenz detektiert werden (A–E). Die höchste Fluoreszenzintensität wurde bei 80%-CM beobachtet (B). In niedrigeren CM-Konzentrationen war die Fluoreszenz schwach ausgeprägt, in MEM-20% nicht mehr nachweisbar (F, I, L). Auch in MEM-0% verlief die Untersuchung auf VE-Cadherin negativ (G, J, M). 300-400fache Vergrößerung.

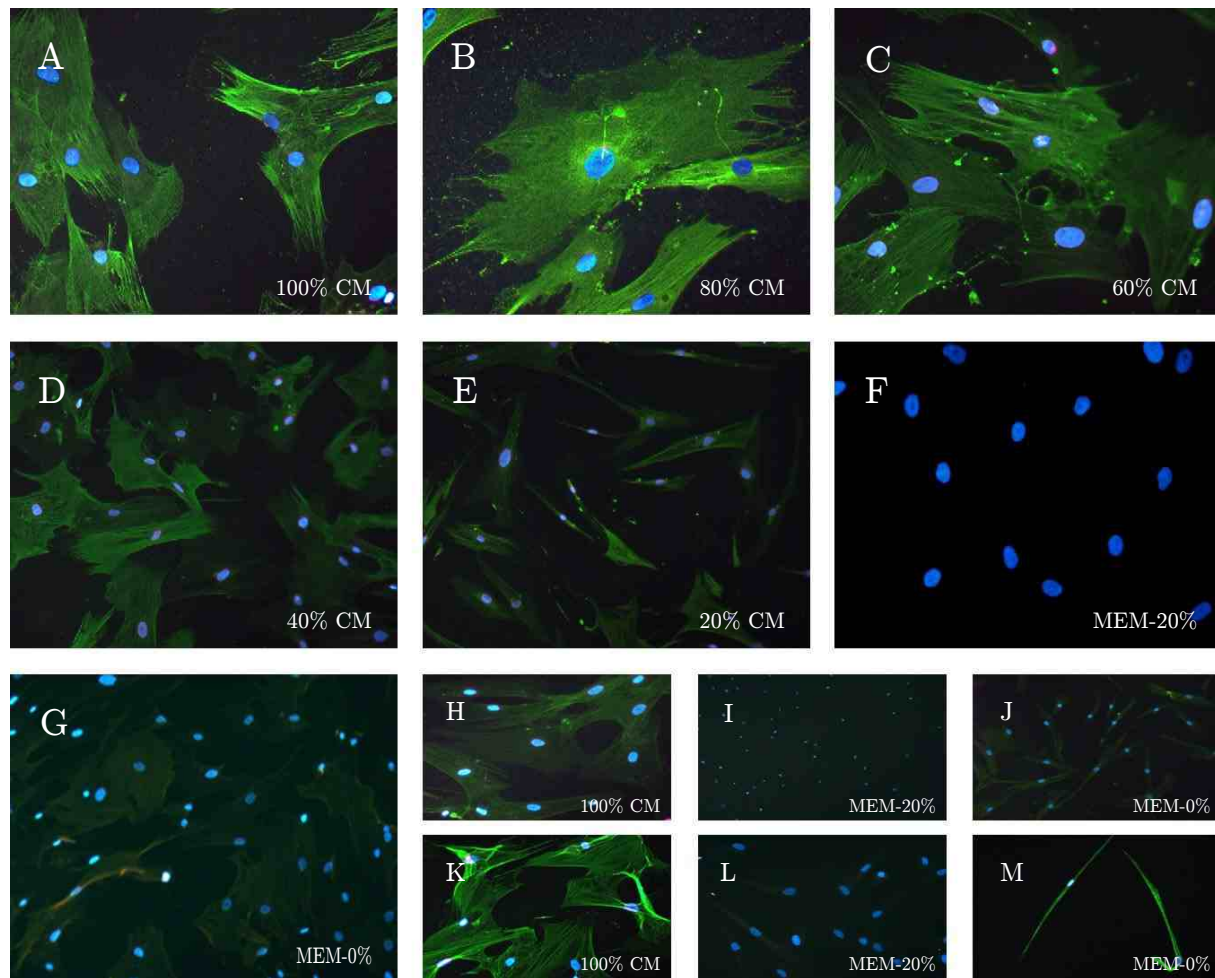


Abbildung 3.11: Nestin-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von Nestin in hMSC aus drei verschiedenen Linien mittels Immunfluoreszenz. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. Die meisten Nestin-positiven Zellen wurden in 80% CM beobachtet (B). Mit abnehmender CM-Konzentration verminderte sich auch die Fluoreszenzintensität und war bei 20% CM nur noch schwach ausgeprägt (E). Im Gegensatz zur serumfreien Kontrolle (G, J, M) jedoch war Nestin auch in MEM-20% zu detektieren (F, I, L). 300-400fache Vergrößerung.

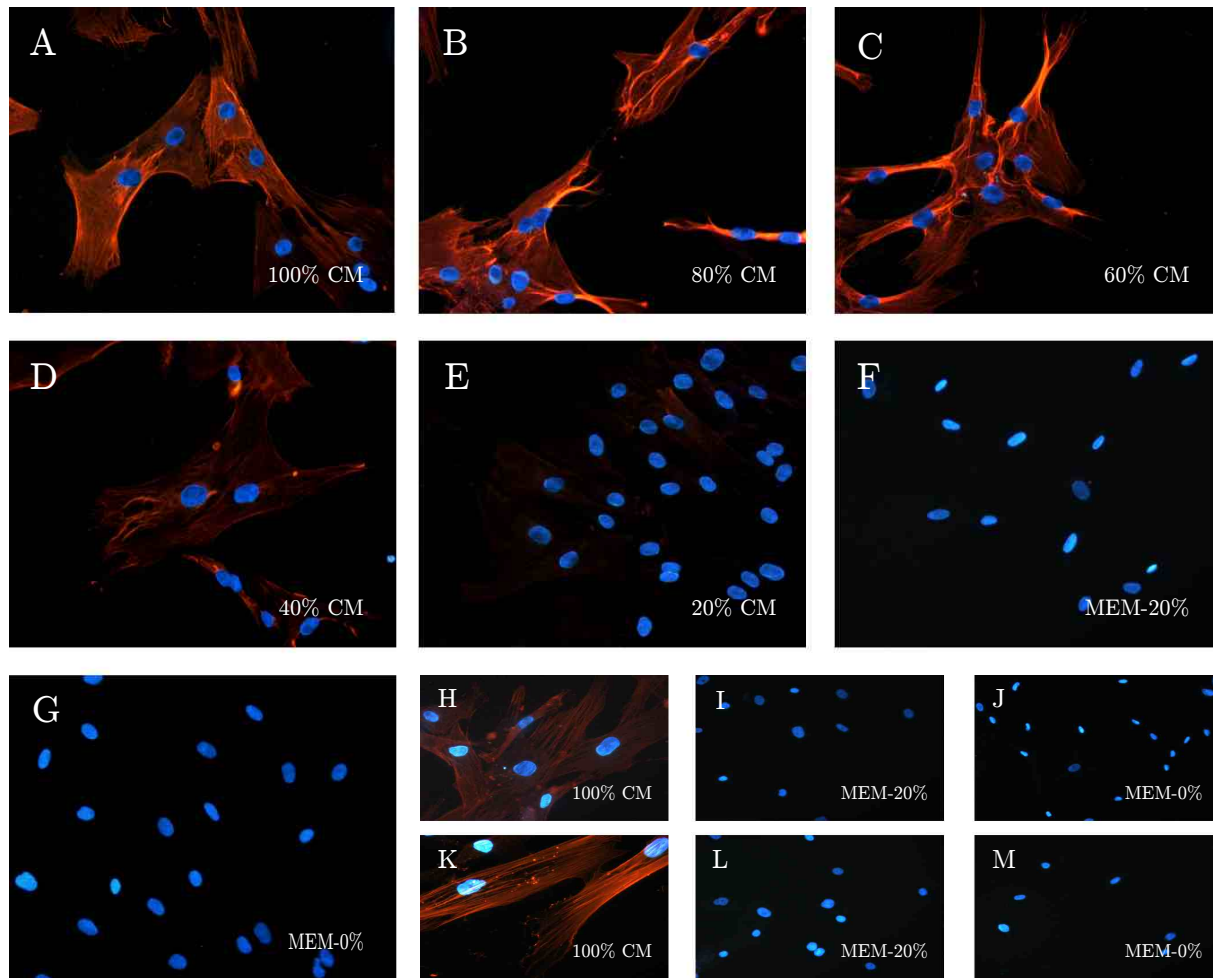


Abbildung 3.12: NG2-Fluoreszenzfärbung. Nachweis von NG2 in hMSC aus drei verschiedenen Linien mittels Immunfluoreszenz. hMSC der dritten Passage (A–G), hMSC der zweiten Passage (H–J und K–M). A, H, K = 100%, B = 80%, C = 60%, D = 40%, E = 20% CM. F, I, L = MEM-20%. G, J, M = MEM-0%. Die Fluoreszenzintensität der Färbung von NG2 in hMSC schien in tumorkonditioniertem Medium vergleichsweise konstant hoch (A–E), jedoch mit einer leichten Abschwächung der in den unteren CM-Konzentrationsstufen (E). NG2 war weder in in MEM-20% noch in MEM-0% nachzuweisen. 300-400fache Vergrößerung.

Die quantitative Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte durch Ermittlung des Anteils Fluoreszenz-positiver hMSC an allen hMSC pro Well. Das Ergebnis zeigte, dass die Marker α -SMA, Desmin, CD 151, VE-Cadherin, Nestin und NG2 in Abhängigkeit von der CM-Konzentration unterschiedlich stark exprimiert wurden. Meist bestand eine positive Korrelation zwischen der CM-Konzentration und der Expression dieser Marker (Abb. 3.13, 3.14, 3.15).

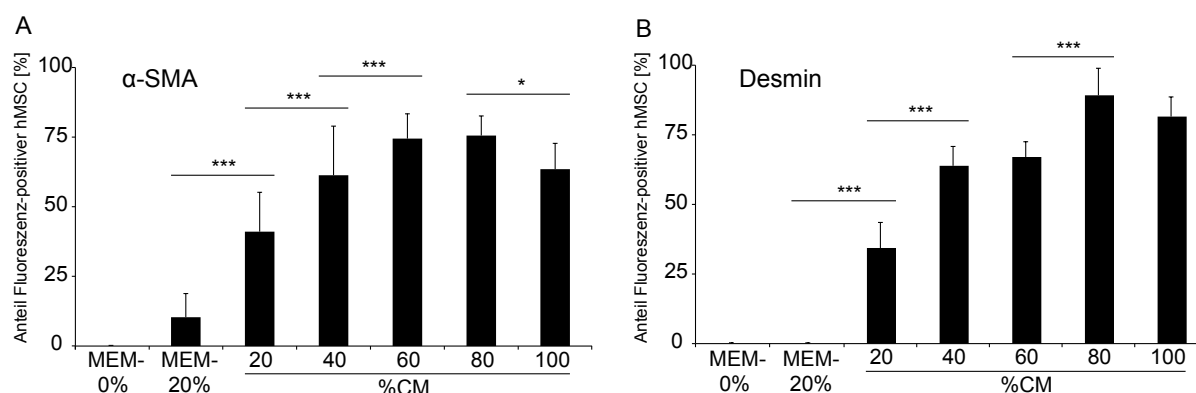


Abbildung 3.13: Immunfluoreszenzfärbung der Muskelzellmarker α -SMA (A) und Desmin (B). Anteil der Fluoreszenz-positiven hMSC in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen tumorkonditionierten Mediums (20-100% CM) gegenüber MEM-20% und MEM-0%. Der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen war bei beiden Marker auf jeder CM-Konzentrationsstufe signifikant größer als in MEM-20% (min. p-value < 0,001). Um die Abhängigkeit zur CM-Konzentration zu demonstrieren, wurde der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen auf jeder CM-Konzentrationsstufe zur nächst niedrigeren Stufe verglichen (Symbole oberhalb der Klammern). Alle Werte basieren auf einer mittleren Zelldichte von $7,72 \times 10^4$ Zellen/ml, welche keine signifikanten Differenzen zwischen den getesteten Wells zeigte (p = 0,11). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

HMSC, die auf α -SMA untersucht wurden, zeigten keinen Nachweis dieses Markers in serumfreiem MEM-0%. Ein kleiner Anteil der Zellen war jedoch positiv in MEM-20% (9,5 +/- 8,5%), und die Anzahl positiver Zellen nahm in Anwesenheit tumorkonditionierten Mediums stetig zu (Abb. 3.13, A; Abb. 3.5). Die meisten α -SMA-positiven Zellen wurden dabei in 80% CM ermittelt (75,6 +/- 7,04%).

Während die Marker Desmin, CD 151, VE-Cadherin und NG2 in Abwesenheit von tumorkonditionierten Medium (MEM-0% und MEM-20%) nicht nachweisbar gewesen sind, führte die Anwesenheit von CM zu einer Expression dieser Marker. Dabei konnte für Desmin ein Peak bei 80% CM (89,2 +/- 9,71%; Abb. 3.13, B), für CD 151 bei 100% CM (73,5 +/- 11,66%; Abb. 3.14, A) und für VE-Cadherin und NG2 bei jeweils 80% CM beobachtet

werden (VE-Cadherin: $51,6 \pm 6,97\%$; Abb. 3.14, B; NG2: $87,4 \pm 4,08\%$; Abb. 3.15, B). Der Perizytenmarker NG2 wurde dabei auch in niedrigen CM-Konzentrationen (20% CM) stark exprimiert ($63,1 \pm 11,93\%$). Der Anteil Fluoreszenz-positiver hMSC war insgesamt bei allen positiv getesteten Markern auf jeder CM-Konzentrationsstufe im Vergleich zur MEM-20%-Kontrolle erhöht (min. p-value < 0,001).

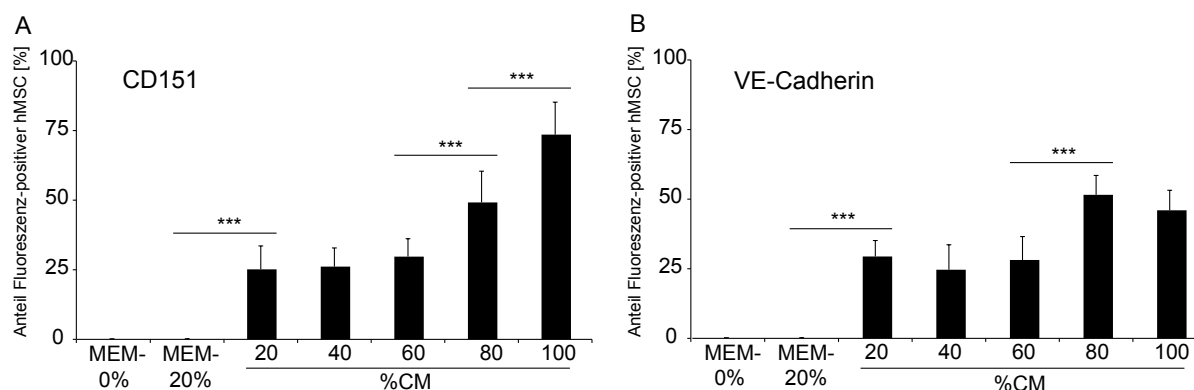


Abbildung 3.14: Immunfluoreszenzfärbung der Endothelzellmarker CD 151 (A) und VE-Cadherin (B). Anteil der Fluoreszenz-positiven hMSC in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen tumorkonditionierten Mediums (20-100% CM) gegenüber MEM-20% und MEM-0%. Der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen war bei beiden Marker auf jeder CM-Konzentrationsstufe signifikant größer als in MEM-20% (min. p-value < 0,001). Um die Abhängigkeit zur CM-Konzentration zu demonstrieren, wurde der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen auf jeder CM-Konzentrationsstufe zur nächst niedrigeren Stufe verglichen (Symbole oberhalb der Klammern). Alle Werte basieren auf einer mittleren Zelldichte von $7,72 \times 10^4$ Zellen/ ml, welche keine signifikanten Differenzen zwischen den getesteten Wells zeigte (p = 0,11). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Ein kleiner Anteil der hMSC, die in serumfreiem MEM-0% kultiviert wurden, zeigte den Nachweis des Perizyten- und Stammzellmarkers Nestin ($5,4 \pm 5,01\%$; Abb. 3.15, A; Abb. 3.11). In Abwesenheit von CM waren hMSC negativ für diesen Marker. In tumorkonditioniertem Medium zeigten die Zellen hingegen eine konzentrationsabhängige Fluoreszenz mit einem Expressions-Peak bei 80% CM ($83,7 \pm 6,45\%$).

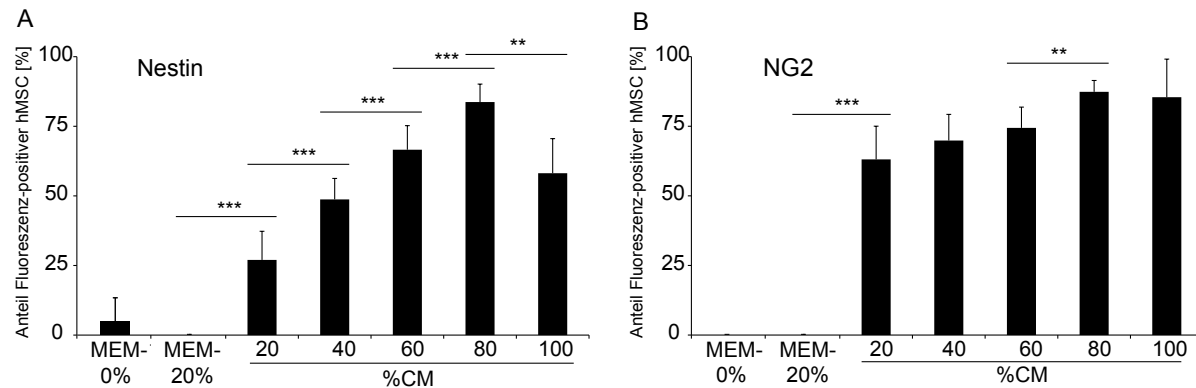


Abbildung 3.15: Immunfluoreszenzfärbung der Perizytenmarker Nestin (A) und NG2 (B). Anteil der Fluoreszenz-positiven hMSC in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen tumorkonditionierten Mediums (20-100% CM) gegenüber MEM-20% und MEM-0%. Der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen war bei beiden Marker auf jeder CM-Konzentrationsstufe signifikant größer als in MEM-20% (min. p-value < 0.001). Um die Abhängigkeit zur CM-Konzentration zu demonstrieren, wurde der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen auf jeder CM-Konzentrationsstufe zur nächst niedrigeren Stufe verglichen (Symbole oberhalb der Klammern). Alle Werte basieren auf einer mittleren Zelldichte von $7,72 \times 10^4$ Zellen/ ml, welche keine signifikanten Differenzen zwischen den getesteten Wells zeigte ($p = 0,11$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.4 CM-induzierte Bildung mikrovaskulärer Strukturen bei hMSC und HUVEC

Die Effekte tumorkonditionierten Mediums auf die Bildung tubulärer Strukturen und interzellulärer Verbindungen von humanen mesenchymalen Stammzellen bzw. Endothelzellen wurde im Tube Formation Assay untersucht. Dazu wurden hMSC und HUVEC jeweils auf Matrigel ausgesät und in einer Konzentrationsreihe tumorkonditionierten Mediums (20-100% CM), im jeweiligen Standardmedium (MEM-20% für hMSC bzw. ECGM für HUVEC) und in MEM-0% für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Analyse der Anzahl ringförmiger, geschlossener kapillarähnlicher Strukturen (Tubes) pro Well, deren interzellulärer Verknüpfungspunkte (Branching points) pro Well sowie der Länge der gebildeten Tubes. Anhand dieser Parameter sollte das angiogene Potenzial humaner mesenchymaler Stammzellen abgeschätzt werden.

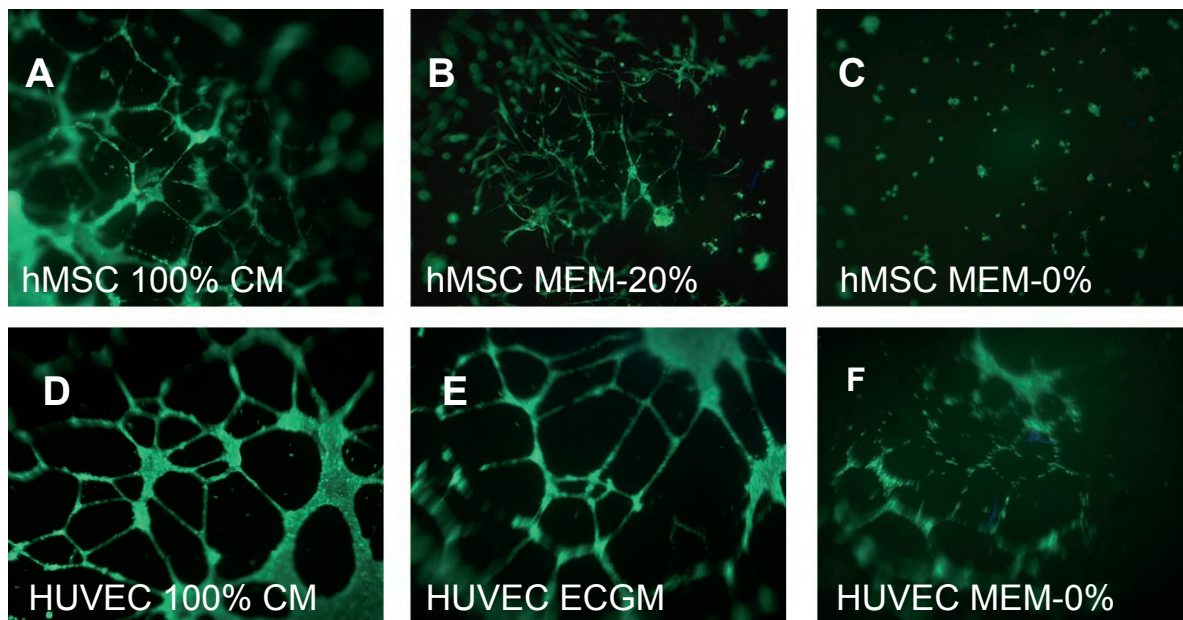


Abbildung 3.16: Bildung dreidimensionaler tubulärer Strukturen von hMSC und HUVEC in Abhängigkeit von CM. Fluoreszenzmarkierte Tubes aus hMSC (hier der zweiten Passage, A-C) und HUVEC (D-F) im Tube Formation Assay nach 24-stündiger Inkubation. 350-400fache Vergrößerung.

Abbildung 3.16 zeigt beispielhaft fluoreszenzmarkierte hMSC der zweiten Passage und primäre HUVEC in jeweils tumorkonditioniertem Medium (100% CM), MEM-20% bzw. ECGM und MEM-0%. Zu erkennen ist die spinnennetzartige Verdichtung eines feinen Geflechts aus hMSC-Tubes in 100% CM gegenüber der MEM-20%-Kontrolle (Abb. 3.16, A, B), wohingegen nahezu keine Tubes in MEM-0% gebildet wurden (Abb. 3.16, C). HUVEC konnten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CM Tubes bilden, wobei das Netzwerk mit steigender CM-Konzentration zur Vergrößerung tendierte (Abb. 3.16, D–F). Im Folgenden sind die einzelnen Parameter, also Anzahl der Tubes, Branching points und Länge der Tubes, gesondert aufgeführt.

3.4.1 Anzahl neu gebildeter Tubes aus hMSC und HUVEC

Die Abbildung 3.17 zeigt die Anzahl der in Matrigel gebildeten Tubes aus hMSC und HUVEC in Abhängigkeit von der Konzentration gliomkonditionierten Mediums (20-100% CM), MEM-20% und MEM-0%. HMSC zeigten dabei eine signifikante Mehrbildung an

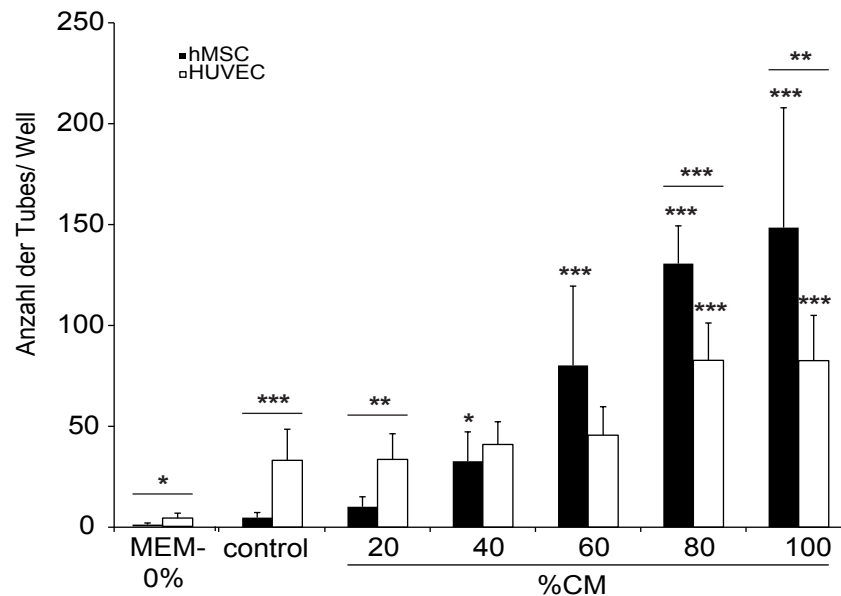


Abbildung 3.17: Anzahl der aus hMSC und HUVEC gebildeten Tubes in jeweils einer Konzentrationsserie gliomkonditionierten Mediums (20-100% CM), Kontrollmedium (control; MEM-20% für hMSC, ECGM für HUVEC) sowie MEM-0%. Oberhalb der Fehlerindikatoren ist das Signifikanzniveau in Relation zur Kontrolle (control) angegeben. Die Symbole oberhalb der Klammern beziehen sich jeweils auf den Unterschied zwischen hMSC und HUVEC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tubes bei allen getesteten CM-Konzentrationsstufen zwischen 40% und 100% in Relation zu MEM-20% ($p < 0,05$). Die Anzahl der Tubes korrelierte positiv mit den CM-Konzentrationsstufen. Verglichen mit CM-freiem MEM-0% konnten hMSC in 100% CM signifikant mehr Tubes bilden ($p < 0,001$).

HUVEC bildeten die meisten Tubes in Anwesenheit hoher CM-Konzentrationen (80% und 100% CM), ebenfalls mit positiver Korrelation zu den steigenden CM-Konzentrationsstufen. Dennoch konnten hMSC in höheren CM-Konzentrationen (80% und 100% CM) mehr Tubes bilden als HUVEC, obwohl beide Zellarten mit je einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ /ml ausgesät worden waren (max. p-value $< 0,01$).

3.4.2 Anzahl der Branching points innerhalb der hMSC- und HUVEC-Netzwerke

CM-hMSC zeigten entsprechend mehr Branching points zwischen 40% und 100% CM als in MEM-20% ($p < 0,001$) und in MEM-0% ($p < 0,001$, Abb. 3.18). Auch hier konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von Branching points und den CM-Konzentrationsstufen gezeigt werden.

Auch HUVEC formten mehr Branching points in Anwesenheit von CM (20-100%) im Vergleich zum Kontrollemdium (ECGM; min. p-value $< 0,001$). Die Bildung der Branching points korrelierte positiv mit den getesteten CM-Konzentrationsstufen. Verglichen mit MEM-0% bildeten HUVEC mehr Branching points in Anwesenheit von 100% CM ($p < 0,001$).

Im Vergleich bildeten hMSC mehr Branching points in mittleren bis hohen CM-Konzentrationen (40-100% CM) als HUVEC (min. p-value $< 0,05$).

3.4.3 Länge der gebildeten Tubes aus hMSC und HUVEC

Die mittlere Länge der gebildeten Tubes aus hMSC und HUVEC wurde untersucht, um die Netzwerke weiterhin zu charakterisieren (Abb. 3.19). hMSC-Tubes waren dabei signifikant länger in Anwesenheit von CM (20-80% CM) als in MEM-20% ($p < 0,001$). Dennoch nahm die mittlere Länge der hMSC-Tubes zwischen 40% und 100% CM ab und war schließlich in 100% CM nicht signifikant größer als in MEM-20%.

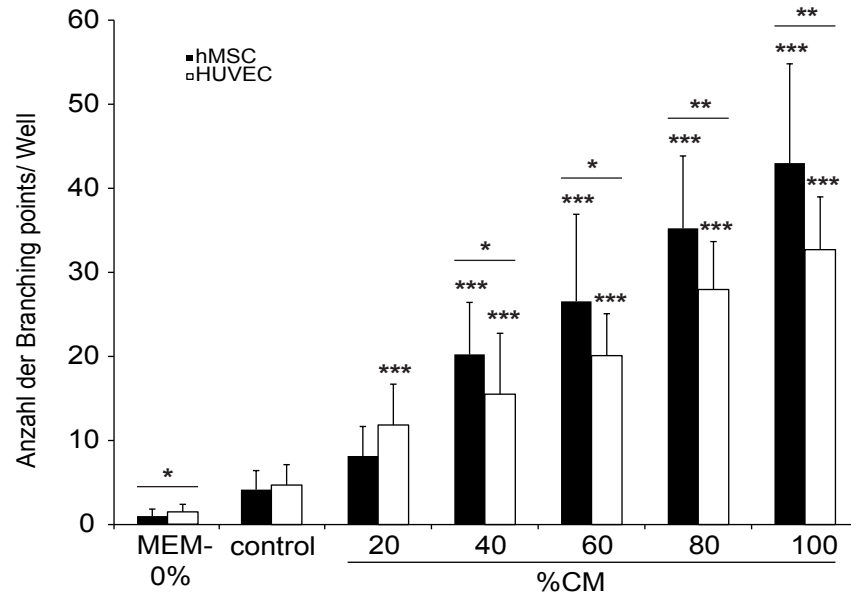


Abbildung 3.18: Anzahl der Branching points innerhalb der gebildeten Netzwerke aus hMSC und HUVEC in jeweils einer Konzentrationsserie gliomkonditionierten Mediums (20-100% CM), Kontrollmedium (control; MEM-20% für hMSC, ECGM für HUVEC) sowie MEM-0%. Oberhalb der Fehlerindikatoren ist das Signifikanzniveau in Relation zur Kontrolle (control) angegeben. Die Symbole oberhalb der Klammern beziehen sich jeweils auf den Unterschied zwischen hMSC und HUVEC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dem gegenüber stehen HUVEC, deren Tube-Länge positiv mit den CM-Konzentrationsstufen zwischen 60% und 100% CM korrelierte. Der Unterschied zwischen der mittleren Tube-Länge von HUVEC in 20% oder 40% CM zu ECGM war nicht signifikant. In serumfreiem MEM-0% bildeten sowohl hMSC als auch HUVEC kürzere Tubes als in tumorkonditioniertem Medium (100% CM; $p < 0,001$).

Im Vergleich zu HUVEC formten hMSC längere Tubes in den niedrigen CM-Konzentrationsstufen (20% und 40%; $p < 0,001$). Bei 60% CM konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen hMSC und HUVEC beobachtet werden, und in hohen CM-Konzentrationen (80% und 100%) zeigten HUVEC längere Tubes als hMSC ($p < 0,001$).

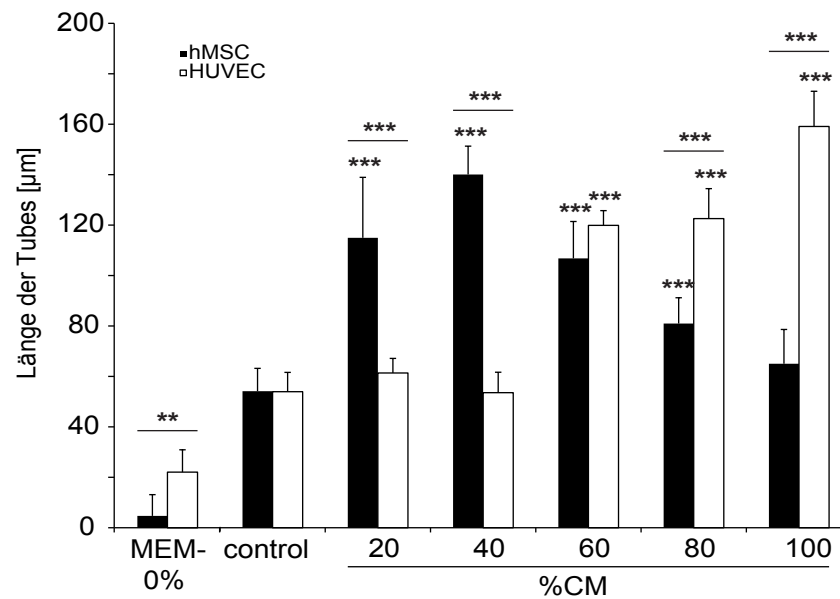


Abbildung 3.19: Länge der aus hMSC und HUVEC gebildeten Tubes in jeweils einer Konzentrationsreihe gliomkonditionierten Mediums (20-100% CM), Kontrollmedium (control; MEM-20% für hMSC, ECGM für HUVEC) sowie MEM-0%. Oberhalb der Fehlerindikatoren ist das Signifikanzniveau in Relation zur Kontrolle (control) angegeben. Die Symbole oberhalb der Klammern beziehen sich jeweils auf den Unterschied zwischen hMSC und HUVEC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit wurden hMSC auf ihren möglichen Phänotyp und ihre potenzielle Rolle innerhalb der perivaskulären Nische des GBM untersucht. Bisher konnte die Hypothese, die perivaskuläre Nische sei eine bevorzugte Umgebung für hMSC in stark vaskularisierten Geweben, nur für residente Populationen Stammzell-artiger Zellen gestützt werden [220,221]. Beachtet man den gezielten Tropismus von hMSC in das Tumorgewebe *in-vitro* und *in-vivo* [12,152,153] sowie ihre Fähigkeit zur Integration in neu gebildete Gefäße *in-situ* [16,17] drängt sich zunehmend die Frage auf, ob sich hMSC unter dem Einfluß der Tumorzellen gerichtet differenzieren und eine Funktion innerhalb der perivaskulären Nische einnehmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Perizyten-artigen Zellen mit pro-angiogenem Potenzial *in-vitro* hin. Die Differenzierung der hMSC in gliomkonditioniertem Medium (CM-hMSC) zu dieser Zellart kann ein Hinweis auf deren Beitrag zur Malignität des GBM darstellen, da Perizyten endotheliale Funktionen während der Neovaskularisation steuern können und maßgeblich an der Stabilität, Integrität und Permeabilität des Endothels pathologischer Gefäße beteiligt sind [222,223].

4.1 Charakterisierung der verwendeten hMSC-Kultur

4.1.1 Identifikation isolierter Zellen mittels FACS-Analyse

Da aus der Isolierung von Zellen aus Knochenmark mittels Ficoll-Dichtegradient eine Reihe mononukleärer Zellarten gewonnen werden können, die morphologische Eigenschaften

mesenchymaler Stammzellen besitzen, wurden die Isolate in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe vor ihrer Verwendung einer Charakterisierung mittels FACS-Analyse unterzogen. Dabei waren die Oberflächenmarker CD 105 und CD 44 nachweisbar, während die Zellen für andere Marker mononukleärer Zelltypen des Knochenmarkes wie CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ waren. In Kultur zeigten die hier verwendeten Zellen proliferatives Wachstum unter FBS-Supplementierung, wuchsen in Kolonien adhärent auf Kulturflaschenböden, wurden nach 16–19 Tagen konfluent und zeigten eine typische, fibroblastenartige Morphologie. Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Forschungsgruppen überein und zeigen, dass mit Hilfe des Ficoll-Dichtegradienten mesenchymale Stammzellen aus den Knochenmarkaspiraten isoliert wurden [19, 144].

4.1.2 HMSC weisen in Anwesenheit von CM andere morphologische Eigenschaften auf als in dessen Abwesenheit

Der Vergleich zwischen hMSC, die in Medien absteigender CM-Konzentration (100-20% CM), in MEM-20% und MEM-0% inkubiert wurden, ergab Unterschiede in deren Morphologie. So verloren hMSC mit steigender CM-Konzentration ihre fibroblastoide Erscheinung und wurden zunehmend flächig, zeigten einen vergrößerten Kern und häufig 1–2 lange, schmale zytoplasmatische Fortsätze. Des weiteren lagen die Zellen meist nicht mehr dicht im Zellverband, sondern isoliert vor. HMSC hingegen, die in Abwesenheit von CM und Serum (MEM-0%) inkubiert wurden, waren zunehmend spindelförmig und hatten wenig Zytoplasma. In ihrer Anzahl waren sie vermindert und nach 16 Tagen Inkubation nicht konfluent.

Die morphologischen Unterschiede zwischen den Zellkulturen können auf eine verschieden gerichtete Differenzierung der hMSC hinweisen. Die Charakteristika von Zellen aus *in-vitro*-Kulturen lassen sich allerdings aufgrund der fehlenden Kommunikation mit anderen Zelltypen und Faktoren der ECM schwer einer typischen Zellart zuordnen. Hinzu kommt, dass hMSC-Kulturen sowohl in hohen CM-Konzentrationen (100-80% CM) als auch in MEM-0% eine verminderte Anzahl vitaler Zellen gegenüber serumhaltigen Medien zeigten, was in beiden Fällen auf ein regressives Wachstumsverhalten hindeutet. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Morphologie der Zellen trotz Abwesenheit von Serum in den beiden Ansätzen aus 100% CM und MEM-0% deutlich unterschied. Zudem deutet das Vorhandensein von vergleichsweise viel Zytoplasma und großem Zellkern in hoch konzentriertem CM gegenüber wenig Zytoplasma und kleinem Zellkern in MEM-0% auf einen aktiveren Zustand

der Zellen in An- als in Abwesenheit von CM hin. Wachstumsfaktoren, die serumfreien Medien zugeführt werden, können eine hMSC-Differenzierung induzieren, deren Kulturen sich ferner expandieren lassen. Dies ist beispielsweise im Bereich des *Tissue-Engineering* etabliert, um die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in eine chondrozytäre Linie zu lenken [224].

In-vitro können Beobachtungen über eine CM-gerichtete Differenzierung anhand morphologischer Charakteristika insgesamt nur hinweisend sein. Eine immunologische Phäotypisierung und Charakterisierung, beispielsweise durch indirekte Immunfluoreszenz, ist für einen Vergleich besser geeignet und soll im Folgenden erörtert werden.

4.2 Immunphänotypische Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen

4.2.1 Nachweis von Markern glatter Muskelzellen auf hMSC

Die untersuchten CM-hMSC waren positiv für die glattmuskulären Marker α -SMA und Desmin, nicht jedoch für glattmuskuläres Myosin. Bei beiden positiv getesteten Markern korrelierte die Fluoreszenzintensität angefärbter hMSC mit der CM-Konzentration. In MEM-0% waren beide Marker negativ, in MEM-20% hingegen war α -SMA im Gegensatz zu Desmin schwach nachweisbar. HAoSMC reagierten in der Kontrollfärbung positiv auf den Myosin-Marker.

Der α -SMA-Ak wird häufig als Marker glattmuskulärer Differenzierung verwendet, ist allerdings auch in anderen kontraktile Zellen wie Perizyten und Myofibroblasten nachzuweisen [188, 190, 191]. Er war auch auf hMSC in MEM-20% schwach positiv. Dies ist mit Ergebnissen früherer Experimente zu vereinbaren, die zeigen konnten, dass α -SMA auch auf primären hMSC exprimiert und dort mit den kontraktile Eigenschaften dieser Zellen in Verbindung gebracht wird [225].

Desmin ist zwar hauptsächlich in glatten Muskelzellen, Skelett- und Herzmuskelzellen zu finden [195], wird allerdings auch als Perizyten-Marker verwendet [196, 197]. Auf Endothelzellen ist Desmin hingegen nicht nachweisbar [187]. Insofern ist der positive Nachweis von Desmin wenig hilfreich bei der Unterscheidung zwischen einer möglichen muskulären oder

perizytären Differenzierung, spricht jedoch eindeutig gegen eine Entwicklung zu Endothelzellen.

Der verwendete Antikörper gegen glattmuskuläres Myosin ist ein zuverlässiger Marker zur Identifikation glatter Muskelzellen [188]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Kontrollfärbung mit humanen vaskulären Muskelzellen konnte dies bestätigen. Der fehlende Nachweis von Myosin auf CM-hMSC spricht in Kombination mit dem positiven Resultat für VE-Cadherin gegen eine Differenzierung der hMSC zu glatten Muskelzellen *in-vitro* [188, 226, 227].

4.2.2 Nachweis von Endothelzellmarkern auf hMSC

Die Existenz endothelialer Progenitorzellen im adulten Organismus wird kontrovers diskutiert und es wird postuliert, dass ihr Auftreten weitestgehend auf den Rahmen pathologischer Neovaskularisation beschränkt ist [228, 229]. Den ersten Hinweis auf die Existenz solcher Progenitorzellen lieferten *in-vitro* Studien mit embryonalen Mäusestammzellen (mES) [230]. Diese konnten sich sowohl zu endothelialen als auch zu glatten Muskelzellen differenzieren, je nach Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren im Kulturmedium [231, 232]. Ähnlich den mES können sich auch hMSC *in-vitro* sowohl endothelial als auch glattmuskulär differenzieren. Ungeklärt ist jedoch, ob diesen aus hMSC hergeleiteten Zellen *in-vivo* eine relevante Funktion zukommt [233]. Es besteht zunehmende Evidenz, dass hMSC nicht signifikant als Resource neuer Endothelzellen involviert sind [234–237], und dass die Transdifferenzierung von hMSC zu Endothelzellen zwar stattfindet, jedoch ein äußerst seltenes Ereignis darstellt [238].

In den vorliegenden Versuchen waren die Endothelzellmarker CD 151 und VE-Cadherin, insbesondere in den hohen CM-Konzentrationen (100-80% CM) auf CM-hMSC nachzuweisen. Beide Marker waren zudem negativ in MEM-20% und MEM-0% und zeigten, ähnlich α -SMA und Desmin, CM-konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten. Doch wenn gleich diese beiden Marker hauptsächlich zur Detektion von Endothelzellen verwendet werden, ist ihre Expression nicht auf diese Zellen beschränkt. CD 151 konnte beispielsweise auch auf glatten Muskelzellen und Perizyten, VE-Cadherin auch auf Perineuralzellen und Perizyten-artige Zellen aus dem Knochenmark gezeigt werden [239–242].

Das Glykoprotein vWF hingegen, das als hochspezifisch für Endothelzellen gilt und nicht

auf Perizyten oder glatten Muskelzellen exprimiert wird, konnte in unseren Versuchen nur auf HUVEC detektiert werden, nicht jedoch auf CM-hMSC [186, 187]. Zusammen mit dem positiven Nachweis von Desmin auf CM-hMSC ist eine GBM-induzierte Differenzierung zu Endothelzellen daher unwahrscheinlich.

Obwohl der Nachweis von CD 151 und VE-Cadherin auf CM-hMSC nicht richtungsweisend in Bezug auf deren Differenzierung ist, kann er einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von hMSC bei der tumorinduzierten Neovaskularisation geben. Neben der Modulation von Zelladhäsion und -migration von Endothelzellen spielt CD 151 möglicherweise eine Rolle als Cofaktor im Rahmen der pathologischen Neovaskularisation, da gezeigt werden konnte, dass es die Stabilität von Endothel-Tubes *in-vitro* durch Modulation Laminin-bindender Integrine erhöht [179]. Dieser pro-angiogene Effekt scheint dabei insbesondere bei der pathologischen Neoangiogenese von Bedeutung zu sein. Darauf deuten Untersuchungen CD 151-defizienter Mäuse hin, die zwar keine Defekte während der physiologischen Vaskulogenese, jedoch eine deutliche Beeinträchtigung der pathologischen Neovaskularisation in einer Reihe *in-vivo* Assays zeigten. *In-vitro* bildeten Endothelzellen CD 151-defizienter Mäuse zudem weniger Tubes im TFA [179]. Auch für glatte Muskelzellen und Perizyten wird der Nachweis von CD 151 mit der Tumorangiogenese in Verbindung gebracht, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind [239, 240].

Das Adhäsionsprotein VE-Cadherin kann den TGF- β -Signalweg aktivieren, der eine wichtige Rolle sowohl bei der Neoangiogenese als auch der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark spielt [12, 201]. Die Integrität interzellulärer Junctionen ist darüber hinaus ein wichtiger Faktor für die Stabilität des Endothels. VE-Cadherin basierte, adhärenzte Verbindungen sorgen für eine restriktive Endothelbarriere [243]. Studien mit VE-Cadherin defizienten Mäusen erbrachten, dass eine Vaskulogenese ohne das Adhäsionsprotein zwar stattfindet, die Gefäße jedoch in einem späteren Stadium kollabieren [244].

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz weder auf eine glattmuskuläre noch eine endotheliale Differenzierung der CM-hMSC schließen. Der Nachweis der Endothelzellmarker CD 151 und VE-Cadherin könnte jedoch einen Hinweis auf eine potenziell pro-angiogene, Gefäß-stabilisierende Funktion dieser Zellen geben.

4.2.3 Das Gesamtprofil der getesteten Marker spricht für eine perizytäre Differenzierung der CM-hMSC

Perizytäre Marker

CM-hMSC waren positiv für Nestin und NG2, wobei der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen bei beiden Markern positiv mit der CM-Konzentration korrelierte. Im Gegensatz zu NG2 war Nestin auch in MEM-0% gering positiv. Dies ist mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vereinbar, die eine Expression von Nestin auch auf nativen mesenchymalen Stammzellen nachweisen konnten [245].

NG2 wird in großen Mengen während der physiologischen sowie der pathologischen Angiogenese vornehmlich von muralen Zellen neu gebildeter Kapillaren exprimiert [246]. Während der Embryogenese wird NG2 von Perizyten wachsender Hirnkapillaren gebildet, während die Expression im adulten ZNS ganz vorwiegend in Phasen gesteigerter, pathologischer Neovaskularisation stattfindet [247–250]. NG2-positive murale Zellen können auf lokale Reize aus verletztem Gewebe reagieren, indem sie an den Ort der Gefäßschädigung migrieren [251, 252]. Insofern zeigen diese Zellen Gemeinsamkeiten mit hMSC, für die ein Tropismus in Richtung Gewebeschädigung gezeigt werden konnte [151]. Experimente am Mausmodell demonstrierten, dass die Überexpression von NG2 durch gliale Vorläuferzellen in Glioblastomen in einer direkten Steigerung der Tumorangiogenese resultierte und mit einer schlechteren Prognose der Versuchstiere einherging [218, 253].

Dieser Hinweis auf den Beitrag NG2-exprimierender Zellen zur Neovaskularisation des GBM wird weiterhin durch Untersuchungen bestätigt, die sich mit der Rolle von NG2 in der Neoangiogenese befassen haben. So konnte gezeigt werden, dass NG2 spezifisch und saturierend an Plasminogen und deren *Kringle*-Domänen, bestehend aus Angiostatin (K1-4) und Miniplasminogen (K5), bindet [254]. Die Bindung und Sequestrierung von Angiostatin durch NG2 kann die Neovaskularisation durch Neutralisierung der inhibitorischen Effekte von Angiostatin auf die Endothelzellproliferation und -migration verstärken [254]. Als Oberflächenprotein muraler Zellen bzw. CM-hMSC ist NG2 also potenziell in der Lage, Angiostatin zu neutralisieren, welches anderenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf Endothelzellen während der Neovaskularisation hätte [253, 254]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den möglichen Beitrag NG2-positiver CM-hMSC zur tumorinduzierten Neovaskularisation.

Perizytäre Charakterisierung der CM-hMSC anhand des Expressionsprofils

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass native hMSC unter serumfreien Bedingungen den Perizyten- und Stammzellmarker Nestin exprimieren. Alle anderen getesteten Marker waren hier negativ. Die Supplementierung von FBS führt zum positiven Nachweis von α -SMA, wohingegen Nestin unter diesen Bedingungen nicht mehr nachzuweisen ist. Die Inkubation mit tumorkonditioniertem Medium hingegen führt zu einer konzentrationsabhängigen Expression der Marker Desmin, CD 151, VE-Cadherin, NG2 und Nestin, und α -SMA kann mit steigender CM-Konzentration verstärkt nachgewiesen werden. Weder native noch tumorkonditionierte hMSC werden durch die Expression glattmuskulären Myosins oder vWF charakterisiert.

Insgesamt deutet das Expressionmuster der CM-hMSC darauf hin, dass eine Differenzierung zu Endothelzellen oder glatten Muskelzellen unwahrscheinlich ist.

Aufgrund der Abwesenheit von Myosin in Kombination mit dem Nachweis von VE-Cadherin ist eine Differenzierung zu glatten Muskelzellen nicht anzunehmen [188, 226, 227]. Desmin und α -SMA sind nicht spezifisch für Zellen muskulären Ursprungs, da sie auch in anderen Zellen mit kontraktilen Eigenschaften exprimiert werden [188, 196, 255].

Der fehlende Nachweis von vWF wiederum macht eine Differenzierung zu Endothelzellen sehr unwahrscheinlich [186, 187]. Darüber hinaus waren die Marker α -SMA und Desmin, die beide nicht von Endothelzellen exprimiert werden, positiv für CM-hMSC [187, 188]. Von den beiden anderen, auf CM-hMSC positiv getesteten Endothelzellmarkern wurde CD 151 bereits auf Perizyten und glatten Muskelzellen nachgewiesen, und VE-Cadherin wird beispielsweise auch von perineurialen Zellen und perizyten-artigen muralen Zellen aus dem Knochenmark exprimiert [241, 242].

Zusammengefasst stehen die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz im Einklang mit einer Differenzierung der hMSC zu perizyten-artigen Zellen, da nicht nur die Perizytenmarker Nestin und NG2, sondern auch die Marker α -SMA, Desmin, CD 151 und VE-Cadherin in Abhängigkeit von tumorkonditioniertem Medium nachzuweisen sind [188, 196, 240, 242]. Dem gegenüber stehen die Marker vWF und Myosin, die für Perizyten negativ sind [187, 188].

| | α -SMA* | Desmin* | Myosin | CD 151* | vWF | VE-Cadherin* | Nestin* | NG2* |
|-----|----------------|---------|--------|---------|-----|--------------|---------|------|
| EC | – | – | – | + | + | + | + | – |
| SMC | + | + | + | + | – | – | – | + |
| PC | + | + | – | + | – | + | + | + |

Tabelle 4.1: Profil der getesteten Marker für Endothelzellen (EC), glatte Muskelzellen (SMC) und Perizyten (PC). *auf CM-hMSC positiv getestete Marker. Die Referenzen sind im Text wiedergegeben.

In der Forschung mehren sich Hinweise, dass hMSC auch *in-vivo* Vorläufer neu gebildeter Perizyten während der Vaskularisation darstellen. So stützen beispielsweise Au et al. in ihrer Arbeit die Hypothese, residente hMSC würden als perizytäre Zellen zur Stabilität neu gebildeter Gefäße beitragen, da sie in Ko-Kultur von hMSC mit HUVEC ebenfalls die Marker α -SMA, Desmin und NG2 mittels Immunfluoreszenz detektierten [233]. Darüber hinaus lagerten sich hMSC im murinen Modell nach Ko-Implantation mit HUVEC um deren gebildete Tubes, und zwar ähnlich perivaskulären Zellen als Monolayer um die Endothelzellschicht [233]. Dass CM-hMSC trotz des perizytären Phänotyps Endothelzellmarker exprimierten, steht im Einklang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe Asashima et al., die Perizyten aus Ratten-Hirnen isolierten und sowohl perizytäre als auch endotheliale Marker entdeckten [256]. Dies führten sie auf die Pluripotenz von Perizyten zurück [256]. Die kontraktile Funktion der hMSC mit perizytärem Phänotyp wurde durch die positive Reaktion auf Endothelin-1 demonstriert, einem potenten Induktor der Zellkontraktion [233]. Diese Experimente stützen die Annahme, dass hMSC auch *in-vivo* zu perivaskulären Zellen differenzieren und dort auf physiologische Stimulation reagieren können.

4.3 Angiogenes Potenzial der CM-hMSC in-vitro

4.3.1 HMSC zeigen ein angiogenes Potenzial, das durch die Anwesenheit von CM verstärkt wird

Die Ergebnisse aus dem TFA zeigen, dass gliomkonditioniertes Medium eine konzentrationsabhängige Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch hMSC und HUVEC *in-vitro* induzieren kann. HMSC bildeten signifikant mehr Tubes in Anwesenheit des serumfreien CM als in serumfreiem MEM-0% und FBS-haltigem MEM-20%. Dies impliziert, dass weder die Abwesenheit von FBS noch Serum allein wesentlich zum angiogenen Potenzial der hMSC beitragen, gliomkonditioniertes Medium hingegen pro-angiogene Faktoren enthält,

die hMSC zu einer gesteigerten Bildung von Tubes veranlässt.

Die Fähigkeit der hMSC, spontan kapillarähnliche Strukturen in artifizieller Matrix zu bilden, wurde bereits vielfach untersucht [257, 258]. Die Formierung mikroskopischer Tubes ohne endotheliale Auskleidung wird dabei mit perizytärem Sprouting in Verbindung gebracht [99]. Darüber hinaus produzieren hMSC pro-angiogene Faktoren wie bFGF, VEGF, PlGF, MCP-1, IL-6 [174–176], und schaffen so ein stimulierendes Milieu für lokale Endothelzellen.

Annabi et al. beobachteten, dass hypoxische Kulturbedingungen (1% O₂, 5% CO₂ und 94% Nitrogen) zu einer gesteigerten Bildung muriner MSC-Tubes in Matrigel führten [257]. Die dadurch induzierte VEGF-Expression durch MSC korrelierte mit einer gleichzeitig gesteigerten Genexpression des potenten Angiogenese-Induktors HIF-1 α [257]. hMSC scheinen also mit den Voraussetzungen zur Induktion der Neovaskularisation ausgestattet zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass hMSC nicht nur auf den unspezifischen Stimulus der Hypoxie, sondern auch auf Faktoren gliomkonditionierten Mediums reagieren.

Welche Faktoren dabei im Einzelnen eine Rolle spielen könnten, ist allerdings nur unzureichend erforscht. Hinweise ergeben sich aus Berichten, wonach die neoangiogene Antwort durch Bildung von Tubes durch hMSC, ähnlich wie bei Endothelzellen, besonders von VEGF abhängig zu sein scheint [20]. Darüber hinaus produzieren GBM-Zellen vermehrt PDGF, das wiederum die Expression von PDGF-R auf hMSC stimuliert [48]. Der PDGF-vermittelte Signalweg soll neuesten Erkenntnissen zufolge zu einem wesentlichen Teil Differenzierung und Funktion mesenchymaler Stammzellen während der postnatalen Neovaskularisation modulieren [259]. Zudem führte die kombinierte Expression von SDF-1 und VEGF durch maligne Gliomzellen in Mäusen zu einer verstärkten Bildung von MSC-Tubes *in-vivo* [260]. Schließlich zeigen Ergebnisse einer anderen Arbeit, dass Proliferation, Migrationstendenz und die Fähigkeit zur Bildung dreidimensionaler hMSC-Tubes durch tumorkonditionierte Medien unterschiedlicher Tumorzelllinien gesteigert werden können, und dass der pro-angiogene Wachstumsfaktor FGF-2 einen potenten Induktor in diesem Zusammenhang darstellt [261].

All dies stützt die Hypothese, dass Wachstumsfaktoren und Chemokine des gliomkonditionierten Mediums einen gezielten Einfluß auf die Differenzierung und Funktion mesenchy-

maler Stammzellen ausüben. Die Identifikation dieser Mediatoren könnte in zukünftigen Studien einen zunehmenden Stellenwert einnehmen, um anti-angiogene Therapiestrategien gezielter auf die Pathobiologie des GBM ausrichten zu können. Die Veränderungen innerhalb der hMSC, die durch GBM-Faktoren bedingt zu sein scheinen, könnten Teil der pro-angiogenen Antwort während der Neovaskularisation des GBM sein.

4.3.2 Die Tube-Netzwerke gliomkondionierter hMSC grenzen sich von Endothelzellen ab

Bei vergleichbarer Zelldichte bildeten hMSC mehr Tubes und ein feiner verzweigtes Netzwerk als HUVEC in Anwesenheit von CM. Der morphologische Unterschied zwischen beiden Tube-Netzwerken spricht also weiterhin gegen eine Differenzierung zu Endothelzellen.

Einschränkend muss an dieser Stelle gesagt werden, dass es sich bei den vorliegenden in-vitro Versuchen um Experimente mit Endothelzellen handelt, die aus humanen Umbilikalvenen isoliert wurden. Diese sind nicht gleichzusetzen mit mikrovaskulären Endothelzellen des ZNS, welche für einen morphologischen Vergleich besser geeignet wären. So variiieren endotheliale Zellen verschiedener Organe in ihrem Vermögen, Tubes in Matrigel zu bilden [262]. Die Vaskularisationsarchitektur innerhalb des Glioblastoms wird allerdings als “Venen-artig” beschrieben [263] und HUVEC werden in der Forschung regelhaft zur Untersuchung der Neovaskularisation maligner Gliome eingesetzt [264]. Nach intracranialer Applikation bilden HUVEC im Mausmodell mikrovaskuläre Tubes, die mit wirtseigenen Gefäßen anastomosieren und eine funktionierende Blut-Hirn-Schranke bilden [264].

Dass sich die aus mesenchymalen Stammzellen gebildeten Tubes auch *in-vivo* von Endothelzelltubes unterscheiden, zeigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Aghi et al. Implantierte murine MSC in Gliomen von Mäusen bildeten mikrovaskuläre Strukturen, die eine stark erhöhte mitotische Aktivität aufwiesen als wirtseigene Endothelzell-Tubes. Dies weist auf einen unterschiedlichen Phänotyp der beiden Gefäßnetzwerke hin und stützt die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit [260].

4.3.3 CM-hMSC bilden vergleichbare Zellgeflechte im TFA

Die Komplexität eines Zell-Netzwerkes im Tube Formation Assay kann durch eine Reihe von Faktoren charakterisiert werden. Dazu gehören neben den Verzweigungspunkten und der Anzahl der gebildeten Tubes auch deren Länge [265, 266]. Sowohl hMSC als auch HUVEC bildeten in unseren Versuchen mehr Branching points in Anwesenheit von CM (100% CM) als in MEM-20% und in MEM-0%. Interessanterweise formten hMSC signifikant mehr Branching points in den hohen bis mittleren CM-Konzentrationen (100-40%) als HUVEC, und die mittlere Länge der durch CM-hMSC gebildeten Tubes nahm gleichzeitig mit steigender CM-Konzentration ab 40% CM ab. Dies impliziert gebündelte CM-hMSC-Netzwerke mit einem “spinnennetzartigen” Erscheinungsbild in hohen CM-Konzentrationen.

Dieses Erscheinungsbild erinnert morphologisch an perizytäre Geflechte, wie sie bereits von anderen Forschungsgruppen beschrieben wurden. So zeigten perizytäre Tube-Netzwerke im Vergleich zu endothelialen Vorläuferzellen ebenfalls kleinere, verzweigtere Geflechte mit einer höheren Anzahl an Tubes [263]. Die Existenz dieser endothelfreien Tubes wird mit perizytärem Sprouting in Verbindung gebracht, also der Generierung feiner Sprossen als Leitschiene für Endothelzellen während der frühen Angiogenese [99]. Obwohl potenzielle Funktionen der Perizyten tendenziell späte Ereignisse der Kapillarbildung darstellen wie Gefäßstabilisierung, Bildung der Permeabilitätsbarriere und Regulation des Blutflusses [198, 267–269], mehren sich Hinweise, dass die NG2-positiven Zellen bereits in Frühstadien der Neovaskularisation eine Rolle spielen [270] und möglicherweise sogar an deren Initiation beteiligt sind [99, 219, 268, 271, 272]. Eine Beteiligung der Perizyten an frühen Neovaskularisationsereignissen wurde bereits für das GBM demonstriert [273].

Das Erscheinungsbild der aus CM-hMSC gebildeten, kapillarähnlichen Netzwerke im TFA liefert einen weiteren Hinweis auf die CM-abhängige Differenzierung zu Perizyten-artigen Zellen, da CM-hMSC hier auch funktionelle Gemeinsamkeiten mit Perizyten aufweisen.

4.4 Möglicher Beitrag mesenchymaler Stammzellen zur Tumorstabilität des GBM

Vor dem Einsatz mesenchymaler Stammzellen als zellbasierte Vektoren muss geklärt werden, ob die Zellen durch ihre Eigenschaften nicht möglicherweise einen tumorstabilisierenden Effekt ausüben, der ihren potenziellen therapeutischen Nutzen einschränkt. Phänotyp und Funktion von CM-hMSC lassen vermuten, dass diese Zellen einen tumorfördernden Effekt durch Stabilisierung der Neovaskularisation ausüben.

Mögliche mitogene Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen innerhalb des Tumormilieus werden hingegen kontrovers diskutiert. So migrierten murine MSC im Tierversuch zu disseminiert liegenden Glioblastomzellen und zeigten dort eine antiproliferative Wirkung. Durch Genmodifikation der MSC zur Produktion von IL-2 konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden, was sich in einer verbesserten Prognose der Tiere widerspiegelte [274]. Auch andere Studien lassen einen direkten inhibitorischen Effekt von MSC auf das Wachstum von Tumorzellen vermuten. In Hepatomen (H22), Lymphomen (YAC-1 and EL-4) und Ratten-Insulinomen (INS-1) induzierten murine MSC nach Co-Kultivierung den apoptotischen Zelltod bzw. Arrest des Zellzyklus in der G(0)/G(1) Phase *in-vitro* und *in-vivo* [275]. Diese und andere Studien zeigen, dass mesenchymale Stammzellen antiproliferative Eigenschaften besitzen und sprechen für ihren Einsatz als zellbasierte Vektoren.

Andere Autoren berichten hingegen eine erhöhte Neigung zur Proliferation von Tumorzellen des kolorektalen Adenokarzinoms oder des Mammakarzinoms, die Mäusen zusammen mit mesenchymalen Stammzellen subkutan appliziert wurden [276]. Diese Tumoren zeigten weiterhin eine stärkere Vaskularisation und eine höhere Tendenz zur Metastasierung [276,277].

Die Faktoren, die mesenchymale Stammzellen zur Malignität beitragen lassen könnten, scheinen hauptsächlich in ihrer Kapazität zur Förderung einer Vielzahl von Endothelzellfunktionen innerhalb des Tumormilieus zu liegen [278]. Vieles deutet mittlerweile darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen darauf ausgerichtet sind, an pro-angiogenen Prozessen zu partizipieren, die sie beispielsweise als autolog transplantierte Zellen besser fördern als rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren [20]. Werden HUVEC bei immundefizienten Mäusen intracranial implantiert, so können sie dort funktionelle Gefäße bilden [233]. Diese entwickeln sich allerdings schnell zurück, solange HUVEC nicht durch gentechni-

sche Veränderung zur Expression anti-apoptotischer Faktoren wie z.B. *B-cell lymphoma-2* (bcl-2) angeregt werden [233,279]. Murine embryonale Stammzellen der Linie 10T1/2, die *in-vivo* zu Perizyten differenzieren, können die HUVEC-Tubes auch ohne genetische Modifikation der Endothelzellen stabilisieren [280]. Neuere Untersuchungen haben geprüft, ob hMSC 10T1/2-Zellen funktionell ersetzen können. Dazu wurden HUVEC, allein und zusammen mit hMSC, im Mausmodell intracranial implantiert. Die Bildung vaskulärer Netzwerke wurde mittels Multiphoton-Scanning-Analyse ausgewertet. HUVEC allein bildeten Tubes, die sich erwartungsgemäß nach wenigen Tagen zurückbildeten, während die Koimplantation von HUVEC und hMSC zur Bildung eines vaskulären Netzwerkes führte, das mit wirtseigenen Gefäßen anastomosierte und dessen Funktionalität noch nach 130 Tagen demonstriert werden konnte [233]. Die Vaskularisationsdichte des HUVEC-hMSC-Versuches war mit HUVEC-10T1/2 vergleichbar [233]. Dieses Beispiel deutet darauf hin, dass auch implantierte hMSC durch Unterstützung von HUVEC-Funktionen einen gefäßstabilisierenden Beitrag innerhalb der perivaskulären Nische leisten können.

Die perizytäre Phänotypisierung der CM-hMSC kann einen Hinweis auf ihre potenzielle Funktion im Tumormilieu des GBM geben. Perizyten sind essentiell für Überleben und Erhalt der Zellfunktion lokaler Endothelzellen [222]. Die Besonderheit der Tumor-Perizyten besteht darin, dass sie Stabilität und Funktion pathologischer Blutgefäße aufrecht erhalten [200,223,281]. Therapeutische Strategien gegen diese perizytären Zellen könnten bisherige anti-angiogene Ansätze ergänzen [282]. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass die kombinierte anti-angiogene Therapie aus systemisch verabreichten VEGF- und PDGF-Rezeptor-Kinase-Inhibitoren einen größeren Effekt auf die Tumervaskularisation ausübt als die Verwendung eines der beiden Inhibitoren allein [283]. Auf der anderen Seite muss der Nutzen anti-perizytär ausgerichteter Therapien gegen den möglicherweise nicht unerheblichen Beitrag der Zellen zum Schutz vor Hirnödembildung abgewogen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes, die nachweislich in Richtung des GBM migrieren und sich dort in pathologische Blutgefäße integrieren können, phänotypische und funktionelle Eigenschaften mit Perizyten teilen, wenn sie GBM-spezifischen Faktoren ausgesetzt sind. Diese Beobachtung gilt es bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien mit hMSC als zellbasierte Vektoren zu berücksichtigen, da eine mögliche Stabilisierung und Förderung der pathologischen Neovaskularisation durch diese Zellen einen potenziellen Resistenzfaktor anti-angiogen ausgerich-

teter Therapien darstellt. Da die Mechanismen der GBM-induzierten Neovaskularisation jedoch nach wie vor nicht hinreichend erforscht sind, werden weitere Erkenntnisse über die Interaktionen mesenchymaler Stammzellen mit Glioblastomzellen und Tumorendothelzellen benötigt, nicht nur, um die Pathobiologie des Glioblastoms besser zu verstehen, sondern auch, um das Potenzial neuer Behandlungsstrategien gezielter auszuschöpfen.

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel der Arbeit: Die Tumorangiogenese ist ein wichtiger pathobiologischer Faktor des Glioblastoma multiforme (GBM). Humane mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes (hMSC) können gezielt in Richtung des Tumors migrieren und werden in neu gebildete Gefäße inkorporiert. Phänotyp und Funktion dieser rekrutierten Zellen wurden bisher jedoch nicht hinreichend charakterisiert. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung und das angiogene Potenzial der hMSC in Abhängigkeit von Glioblastom-konditioniertem Medium in-vitro evaluiert. Methoden: Hierzu wurde die Expression endothelialer, glattmuskulärer sowie perizytärer Marker mittels indirekter Immunfluoreszenz in hMSC analysiert, die in unterschiedlichen Konzentrationen tumorkonditionierten Mediums (CM) inkubiert wurden. Das angiogene Potenzial der hMSC in Abhängigkeit von CM wurde mittels Tube Formation Assay (TFA) eruiert. Ergebnisse: Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass in tumorkonditioniertem Medium inkubierte (CM-)hMSC konzentrationsabhängig die Marker CD 151, VE-Cadherin, Desmin, α -Smooth muscle actin (α -SMA), Nestin und *Nerval/glial antigen 2* (NG2) exprimierten, wohingegen keine Expression des Von-Willebrand Faktors (vWF) sowie des glattmuskulären Myosins beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine GBM-induzierte Differenzierung der hMSC zu Perizyten-artigen Zellen wahrscheinlicher ist, als zu endothelialen oder glattmuskulären Zellen. Im TFA zeigten CM-hMSC eine CM-abhängige Bildung kapillarähnlicher Netzwerke, die kleiner und feiner verzweigt waren als diejenigen, die von humanen Endothelzellen (HUVEC) gebildet wurden und darauf hinweisen, dass CM-hMSC neben morphologischen auch funktionelle Eigenschaften mit Perizyten teilen. Schlussfolgerung: Zusammen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine GBM-abhängige Differenzierung der hMSC zu Perizyten-artigen Zellen in-vitro hin. In dieser Funktion sollte das Potenzial der hMSC als mögliche Stabilisatoren und Förderer der tumorinduzierten Neovaskularisation vor einem denkbaren Einsatz als zellbasierte Vektoren neuer Therapiestrategien besser charakterisiert werden, nicht nur, um die Pathobiologie des Glioblastoms besser zu verstehen, sondern auch, um die Effizienz neuer Behandlungsstrategien zu optimieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Lefranc, F., Rynkowski, M., DeWitte, O. & Kiss, R. Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Adv Tech Stand Neurosurg* **34**, 3–35 (2009).
- [2] DeAngelis, L. M., Burger, P. C., Green, S. B. & Cairncross, J. G. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* **44**, 691–5 (1998).
- [3] Hoelzinger, D. B., Demuth, T. & Berens, M. E. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **99**, 1583–93 (2007).
- [4] Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., Maraziotis, T., Papadakis, N. & Varakis, I. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res* **17**, 4747–53 (1997).
- [5] Jain, R. K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48**, 2641–58 (1988).
- [6] Anderson, J. C., McFarland, B. C. & Gladson, C. L. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. *Expert Rev Mol Med* **10**, e23 (2008).
- [7] Ahluwalia, M. S. & Gladson, C. L. Progress on antiangiogenic therapy for patients with malignant glioma. *J Oncol* **2010**, 689018 (2010).
- [8] Desbaillets, I., Diserens, A. C., de Tribolet, N., Hamou, M. F. & Van Meir, E. G. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* **18**, 1447–56 (1999).
- [9] Hamel, W., Westphal, M., Szönyi, E., Escandón, E. & Nikolics, K. Neurotrophin gene expression by cell lines derived from human gliomas. *J Neurosci Res* **34**, 147–57 (1993).
- [10] Platten, M., Wick, W. & Weller, M. Malignant glioma biology: role for tgf-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* **52**, 401–10 (2001).
- [11] Kargiotis, O., Rao, J. S. & Kyritsis, A. P. Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* **78**, 281–93 (2006).

- [12] Birnbaum, T. *et al.* Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* **83**, 241–7 (2007).
- [13] Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 630–8 (2009).
- [14] Strieter, R. M. *et al.* Interleukin-8, a corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* **141**, 1279–84 (1992).
- [15] Cristofaro, B. *et al.* Neutrophin-3 (nt-3) promotes reparative neovascularization and blood flow recovery in a mouse model of limb ischemia. *Atherosclerosis* **199**, 464 (2008).
- [16] Steingen, C. *et al.* Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 1072–84 (2008).
- [17] Dufourcq, P. *et al.* Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells* **26**, 2991–3001 (2008).
- [18] Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–9 (2002).
- [19] Reyes, M. *et al.* Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **113**, 2370 (2001).
- [20] Al-Khalidi, A. *et al.* Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent vegf-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther* **10**, 621–9 (2003).
- [21] Lamagna, C. & Bergers, G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J Leukoc Biol* **80**, 677–81 (2006).
- [22] Vukicevic, S. *et al.* Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* **202**, 1–8 (1992).
- [23] Cavenee, W. K. *Glioblastoma*, in: *WHO Classification of Tumours* (Lyon, IARC Press, 2000).
- [24] Ohgaki, H. & Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 479–89 (2005).
- [25] Davis, F. G., McCarthy, B. & Jukich, P. The descriptive epidemiology of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am* **9**, 581–94 (1999).

- [26] Davis, F. G., Kupelian, V., Freels, S., McCarthy, B. & Surawicz, T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the united states by behavior and major histology groups. *Neuro Oncol* **3**, 152–8 (2001).
- [27] Faber, V., Thödtmann, R. & Marosi, C. [palliative therapy in glioblastoma multiforme: a multimodal concept]. *Wien Med Wochenschr* **156**, 255–9 (2006).
- [28] Zheng, T., Cantor, K. P., Zhang, Y., Chiu, B. C. & Lynch, C. F. Risk of brain glioma not associated with cigarette smoking or use of other tobacco products in iowa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 413–4 (2001).
- [29] Inskip, P. D. *et al.* Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* **344**, 79–86 (2001).
- [30] Savitz, D. A., Checkoway, H. & Loomis, D. P. Magnetic field exposure and neurodegenerative disease mortality among electric utility workers. *Epidemiology* **9**, 398–404 (1998).
- [31] Cavenee, W. K. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg* **92**, 1080–1 (2000).
- [32] Louis, D. N. & von Deimling, A. Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol* **5**, 145–51 (1995).
- [33] Karnofsky, D. & Burchenal, J. *The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer*, in: *Evaluation of Chemotherapeutic Agents* (Columbia Univ Press, 1949).
- [34] Krex, D. *et al.* Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130**, 2596–606 (2007).
- [35] Martinez, R. *et al.* Frequent hypermethylation of the dna repair gene mgmt in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **83**, 91–3 (2007).
- [36] Markert, J. *Glioblastoma multiforme* (Jones Bartlett Publishers, 2004).
- [37] Smirniotopoulos, J. G., Murphy, F. M., Rushing, E. J., Rees, J. H. & Schroeder, J. W. Patterns of contrast enhancement in the brain and meninges. *Radiographics* **27**, 525–551 (2007).
- [38] Diener, H., Hacke, W., Heidelberg, W. & Oertel, W. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Nuerologie*, vol. 4. überarbeitete Auflage of ISBN-9783131324146 (Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2008).
- [39] Louis, D. N. *et al.* The 2007 who classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97–109 (2007).
- [40] Ironside, J., Moss, T. & Louis, D. e. a. *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours* (London: Churchill Livingstone, 2002).

- [41] Kraus, J. A. *et al.* Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* **101**, 311–20 (2001).
- [42] Burger, P. C. Morphologic correlates in gliomas: where do we stand? *Monogr Pathol* 16–29 (1990).
- [43] Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**, 44–51 (1999).
- [44] Campana, A. Geneva foundation for medical education and research (2010). URL <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg5/CNS136.jpg>.
- [45] Garcia y Montemayor, E. Systemic pathology laboratory (2003). URL www.tigerpath.com/images/unit_07/043_Brain.jpg.
- [46] James, C. D., Loius, D. N. & Cavenee, W. K. *Molecular biology of central nervous system tumors* (Cancer: Principles and Practice of Oncology, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2008), 8 edn.
- [47] Reifenberger, G., Kros, J. M., Loius, D. N. & Collins, V. P. *Oligodendroglioma; Anaplastic oligodendroglioma* (World Health Organization. Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC Press, Lyon, France, 2007).
- [48] Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D. & Cavenee, W. K. a. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system* (World Health Organization. Classification of tumours of the nervous system. IARC Press, France, 2007).
- [49] Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. & Westphal, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* **21**, 1624–36 (2003).
- [50] Demuth, T. & Berens, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* **70**, 217–28 (2004).
- [51] Bikfalvi, A. *et al.* Interaction of vasculotropin/vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: binding, internalization, degradation, and biological effects. *J Cell Physiol* **149**, 50–9 (1991).
- [52] Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S. & Risau, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* **114**, 521–32 (1992).
- [53] Brock, T. A., Dvorak, H. F. & Senger, D. R. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca^{2+} and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* **138**, 213–21 (1991).
- [54] Alvarez, J. A. *et al.* Localization of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human glial neoplasms. *Mod Pathol* **5**, 303–7 (1992).

- [55] Goldman, C. K. *et al.* Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multi-forme pathophysiology. *Mol Biol Cell* **4**, 121–33 (1993).
- [56] Clauss, M. *et al.* Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* **172**, 1535–45 (1990).
- [57] Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Vascular endothelial growth factor (vegf) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 902–6 (1991).
- [58] Risau, W. *et al.* Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* **7**, 261–6 (1992).
- [59] Pringle, N., Collarini, E. J., Hart, I. K., Raff, M. C. & Richardson, W. D. Platelet-derived growth factor in central nervous system gliogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **633**, 160–8 (1991).
- [60] Grant, M. B. *et al.* Insulin-like growth factor i acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* **36**, 282–91 (1993).
- [61] Schreiber, A. B., Winkler, M. E. & Derynck, R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232**, 1250–3 (1986).
- [62] Janat, M. F. & Liao, G. Transforming growth factor beta 1 is a powerful modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **150**, 232–42 (1992).
- [63] Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C. H., Herlyn, M. & Westermark, B. Platelet-derived growth factor (pdgf) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing pdgf-bb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 393–7 (1993).
- [64] Pintucci, G. *et al.* Lack of erk activation and cell migration in fgf-2-deficient endothelial cells. *FASEB J* **16**, 598–600 (2002).
- [65] Klagsbrun, M. Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bfgf)-heparin and heparan sulfate interactions. *Semin Cancer Biol* **3**, 81–7 (1992).
- [66] Vlodavsky, I. *et al.* Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem* **45**, 167–76 (1991).

- [67] Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G. & Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* **64**, 259–73 (2002).
- [68] Stummer, W. & Steiger, H.-J. Resection of glioblastoma. *J Neurosurg* **96**, 809–810 (2002).
- [69] Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* **95**, 190–198 (2001).
- [70] Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase iii trial. *Lancet Oncol* **7**, 392–401 (2006).
- [71] Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987–96 (2005).
- [72] Hou, L. C., Veeravagu, A., Hsu, A. R. & Tse, V. C. K. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus* **20**, E5 (2006).
- [73] Hart, M. G. *et al.* Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* CD007415 (2008).
- [74] Walker, M. D. *et al.* Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* **303**, 1323–9 (1980).
- [75] Hart, M. G. *et al.* Chemotherapeutic wafers for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* CD007294 (2008).
- [76] Lee, S. W. *et al.* Patterns of failure following high-dose 3-d conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **43**, 79–88 (1999).
- [77] Salazar, O. M., Rubin, P., Feldstein, M. L. & Pizzutiello, R. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5**, 1733–40 (1979).
- [78] Swennen, M. H. J. *et al.* Delayed radiation toxicity after focal or whole brain radiotherapy for low-grade glioma. *J Neurooncol* **66**, 333–9 (2004).
- [79] Roa, W. *et al.* Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* **22**, 1583–8 (2004).
- [80] Prestwich, R. J., Sivapalasunrtharam, A., Johnston, C., Evans, K. & Gerrard, G. E. Survival in high-grade glioma: a study of survival in patients unfit for or declining radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**, 133–7 (2005).

- [81] Hochberg, F. H. & Pruitt, A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* **30**, 907–11 (1980).
- [82] Prados, M. D. *et al.* Phase iii trial of accelerated hyperfractionation with or without difluoromethylornithine (dfmo) versus standard fractionated radiotherapy with or without dfmo for newly diagnosed patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**, 71–7 (2001).
- [83] Selker, R. G. *et al.* The brain tumor cooperative group nih trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery* **51**, 343–55; discussion 355–7 (2002).
- [84] Tsao, M. N. *et al.* The american society for therapeutic radiology and oncology (astro) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 47–55 (2005).
- [85] Prados, M. D. *et al.* Phase iii randomized study of radiotherapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine with or without budr for treatment of anaplastic astrocytoma: final report of rtog 9404. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 1147–52 (2004).
- [86] Chan, T. A. *et al.* Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with gliasite brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **62**, 1133–9 (2005).
- [87] Grosu, A. L. *et al.* Reirradiation of recurrent high-grade gliomas using amino acid pet (spect)/ct/mri image fusion to determine gross tumor volume for stereotactic fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 511–9 (2005).
- [88] Kim, H. K. *et al.* Results of re-irradiation of primary intracranial neoplasms with three-dimensional conformal therapy. *Am J Clin Oncol* **20**, 358–63 (1997).
- [89] Brat, D. J. & Mapstone, T. B. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* **138**, 659–68 (2003).
- [90] Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–64 (1996).
- [91] Louis, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* **1**, 97–117 (2006).
- [92] Brat, D. J. & Van Meir, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* **84**, 397–405 (2004).
- [93] Brat, D. J. *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **64**, 920–7 (2004).

- [94] Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Activation of the hif pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 293–9 (2001).
- [95] Hu, B. *et al.* Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8904–9 (2003).
- [96] Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685–93 (2003).
- [97] Urbich, C. & Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* **95**, 343–53 (2004).
- [98] Ribatti, D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* **8**, 294–300 (2004).
- [99] Ozerdem, U. & Stallcup, W. B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* **6**, 241–9 (2003).
- [100] Morikawa, S. *et al.* Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* **160**, 985–1000 (2002).
- [101] Brown, E. B. *et al.* In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat Med* **7**, 864–8 (2001).
- [102] Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R. K. Interstitial ph and po2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**, 177–82 (1997).
- [103] Helmlinger, G., Netti, P. A., Lichtenbeld, H. C., Melder, R. J. & Jain, R. K. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol* **15**, 778–83 (1997).
- [104] Wolburg, H. *et al.* Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* **105**, 586–92 (2003).
- [105] Papadopoulos, M. C. *et al.* Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**, 384–95 (2001).
- [106] Gavard, J. & Gutkind, J. S. Vegf controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of ve-cadherin. *Nat Cell Biol* **8**, 1223–34 (2006).
- [107] Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S. & Couraud, P.-O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 842–57 (2009).

- [108] Cuenod, C. A., Fournier, L., Balvay, D. & Guinebretière, J.-M. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced mri and ct assessment. *Abdom Imaging* **31**, 188–93 (2006).
- [109] Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature* **380**, 435–9 (1996).
- [110] Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the vegf gene. *Nature* **380**, 439–42 (1996).
- [111] Sathornsumetee, S. *et al.* Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J Clin Oncol* **26**, 271–8 (2008).
- [112] Norden, A. D., Drappatz, J. & Wen, P. Y. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol* **7**, 1152–60 (2008).
- [113] Raymond, E. *et al.* Phase ii study of imatinib in patients with recurrent gliomas of various histologies: a european organisation for research and treatment of cancer brain tumor group study. *J Clin Oncol* **26**, 4659–65 (2008).
- [114] Wen, P. Y. *et al.* Phase i/ii study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North american brain tumor consortium study 99-08. *Clin Cancer Res* **12**, 4899–907 (2006).
- [115] Ma, H.-I. *et al.* Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (aav) vector. *Gene Ther* **9**, 2–11 (2002).
- [116] Ma, H.-I. *et al.* Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin. *Cancer Res* **62**, 756–63 (2002).
- [117] Peroulis, I., Jonas, N. & Saleh, M. Antiangiogenic activity of endostatin inhibits c6 glioma growth. *Int J Cancer* **97**, 839–45 (2002).
- [118] Joki, T. *et al.* Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* **19**, 35–9 (2001).
- [119] Bikfalvi, A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the vegf/vegfr system. *Biochem Pharmacol* **68**, 1017–21 (2004).
- [120] Lamszus, K. *et al.* Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. *Clin Cancer Res* **11**, 4934–40 (2005).

- [121] Ohlfest, J. R. *et al.* Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther* **12**, 778–88 (2005).
- [122] Verheul, H. M. W. & Pinedo, H. M. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* **7**, 475–85 (2007).
- [123] Bergers, G. & Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 592–603 (2008).
- [124] Barba, D., Saris, S. C., Holder, C., Rosenberg, S. A. & Oldfield, E. H. Intratumoral lak cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J Neurosurg* **70**, 175–82 (1989).
- [125] Bigner, D. D. *et al.* Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81c6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase i trial results. *J Clin Oncol* **16**, 2202–12 (1998).
- [126] Ehteshami, M. *et al.* Treatment of intracranial glioma with in situ interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha gene transfer. *Cancer Gene Ther* **9**, 925–34 (2002).
- [127] Hayes, R. L. *et al.* Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* **76**, 840–52 (1995).
- [128] Yamanaka, R. *et al.* Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase i/ii trial. *Clin Cancer Res* **11**, 4160–7 (2005).
- [129] Rainov, N. G., Gorbatyuk, K. & Heidecke, V. Clinical trials with intracerebral convection-enhanced delivery of targeted toxins in malignant glioma. *Rev Recent Clin Trials* **3**, 2–9 (2008).
- [130] Emrich, J. G. *et al.* Radioiodinated (i-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment. *Am J Clin Oncol* **25**, 541–6 (2002).
- [131] Reardon, D. A. *et al.* Phase ii trial of murine (131)i-labeled antitenascin monoclonal antibody 81c6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol* **20**, 1389–97 (2002).
- [132] Ali, S. *et al.* Combined immunostimulation and conditional cytotoxic gene therapy provide long-term survival in a large glioma model. *Cancer Res* **65**, 7194–204 (2005).
- [133] Candolfi, M. *et al.* Gene therapy for brain cancer: combination therapies provide enhanced efficacy and safety. *Curr Gene Ther* **9**, 409–21 (2009).

- [134] Naviaux, R. K. & Verma, I. M. Retroviral vectors for persistent expression in vivo. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 540–7 (1992).
- [135] Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* **117**, 1456–65 (2007).
- [136] Hamada, H. *et al.* Mesenchymal stem cells (msc) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci* **96**, 149–56 (2005).
- [137] Yang, S.-Y., Liu, H. & Zhang, J.-N. Gene therapy of rat malignant gliomas using neural stem cells expressing il-12. *DNA Cell Biol* **23**, 381–9 (2004).
- [138] Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641–50 (1991).
- [139] Cohen, S., Leshanski, L. & Itskovitz-Eldor, J. Tissue engineering using human embryonic stem cells. *Methods Enzymol* **420**, 303–15 (2006).
- [140] Rodríguez-Gómez, J. A. *et al.* Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of parkinson disease. *Stem Cells* **25**, 918–28 (2007).
- [141] Phinney, D. G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl* **38**, 7–12 (2002).
- [142] Ohgushi, H. & Caplan, A. I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* **48**, 913–27 (1999).
- [143] Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71–4 (1997).
- [144] Conget, P. A. & Minguell, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* **181**, 67–73 (1999).
- [145] Deschaseaux, F. *et al.* Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-cd49a antibody reveals their cd45med,low phenotype. *Br J Haematol* **122**, 506–17 (2003).
- [146] Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259–64 (2001).
- [147] Pan, R.-L. *et al.* Fetal liver-conditioned medium induces hepatic specification from mouse bone marrow mesenchymal stromal cells: a novel strategy for hepatic trans-differentiation. *Cytotherapy* **10**, 668–75 (2008).
- [148] Sasaki, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* **180**, 2581–7 (2008).

- [149] Yang, J., Lou, Q., Huang, R., Shen, L. & Chen, Z. Dorsal root ganglion neurons induce transdifferentiation of mesenchymal stem cells along a schwann cell lineage. *Neurosci Lett* **445**, 246–51 (2008).
- [150] Wakitani, S., Saito, T. & Caplan, A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417–26 (1995).
- [151] da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I. & Nardi, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2287–99 (2008).
- [152] Schichor, C. *et al.* Vascular endothelial growth factor a contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hmsc). *Exp Neurol* **199**, 301–10 (2006).
- [153] Nakamizo, A. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* **65**, 3307–18 (2005).
- [154] Rüster, B. *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* **108**, 3938–44 (2006).
- [155] Hata, N. *et al.* Platelet-derived growth factor bb mediates the tropism of human mesenchymal stem cells for malignant gliomas. *Neurosurgery* **66**, 144–56; discussion 156–7 (2010).
- [156] Tögel, F. *et al.* Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1626–35 (2007).
- [157] Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–8 (2004).
- [158] Block, G. J. *et al.* Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27**, 670–81 (2009).
- [159] Martinet, L. *et al.* A regulatory cross-talk between vgamma9delta2 t lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* **39**, 752–62 (2009).
- [160] Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. & Papamichail, M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* **24**, 74–85 (2006).
- [161] Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–22 (2005).
- [162] Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin e(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**, 42–9 (2009).

- [163] Sato, K. *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of t-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **109**, 228–34 (2007).
- [164] Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress t-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–43 (2002).
- [165] Rafei, M. *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived ccl2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via stat3 inactivation and pax5 induction. *Blood* **112**, 4991–8 (2008).
- [166] Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic t-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619–21 (2004).
- [167] Nasef, A. *et al.* Identification of il-10 and tgf-beta transcripts involved in the inhibition of t-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* **13**, 217–26 (2007).
- [168] Nasef, A. *et al.* Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol* **253**, 16–22 (2008).
- [169] Di Ianni, M. *et al.* Mesenchymal cells recruit and regulate t regulatory cells. *Exp Hematol* **36**, 309–18 (2008).
- [170] Haynesworth, S. E., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and il-1 alpha. *J Cell Physiol* **166**, 585–92 (1996).
- [171] Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M. & Gerson, S. L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) and stromal cells. *J Cell Physiol* **176**, 57–66 (1998).
- [172] Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by cxcl12-cxcr4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–88 (2006).
- [173] Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A. & Carmichael, S. T. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* **26**, 13007–16 (2006).
- [174] Kinnaird, T. *et al.* Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* **109**, 1543–9 (2004).
- [175] Hung, S.-C., Pochampally, R. R., Chen, S.-C., Hsu, S.-C. & Prockop, D. J. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the pi3k-akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2363–70 (2007).

- [176] Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A* **15**, 1751–61 (2009).
- [177] Meirelles, L. d. S., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 419–27 (2009).
- [178] Zheng, Z.-Z. & Liu, Z.-X. Cd151 gene delivery increases enos activity and induces ecv304 migration, proliferation and tube formation. *Acta Pharmacol Sin* **28**, 66–72 (2007).
- [179] Takeda, Y. *et al.* Deletion of tetraspanin cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood* **109**, 1524–32 (2007).
- [180] Lampugnani, M. G. *et al.* A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511–22 (1992).
- [181] Vailhé, B., Kapp, M., Dietl, J. & Arck, P. Human first-trimester decidua vascular density: an immunohistochemical study using ve-cadherin and endoglin as endothelial cell markers. *Am J Reprod Immunol* **44**, 9–15 (2000).
- [182] Zanetta, L. *et al.* Expression of von willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **85**, 281–8 (2000).
- [183] Sadler, J. E. Biochemistry and genetics of von willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **67**, 395–424 (1998).
- [184] Collins, P. W. *et al.* von willebrand factor as a marker of endothelial cell activation following bmt. *Bone Marrow Transplant* **10**, 499–506 (1992).
- [185] Müller, A. M. *et al.* Expression of the endothelial markers pecam-1, vwf, and cd34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol* **72**, 221–9 (2002).
- [186] Wagner, D. D. & Marder, V. J. Biosynthesis of von willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell Biol* **99**, 2123–30 (1984).
- [187] Balabanov, R. & Dore-Duffy, P. Role of the cns microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* **53**, 637–44 (1998).
- [188] Bandopadhyay, R. *et al.* Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol* **30**, 35–44 (2001).
- [189] Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys* **37**, 65–95 (2008).

-
- [190] Skalli, O. *et al.* Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* **37**, 315–21 (1989).
- [191] Schmitt-Gräff, A., Desmoulière, A. & Gabbiani, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* **425**, 3–24 (1994).
- [192] Bär, H., Strelkov, S. V., Sjöberg, G., Aebi, U. & Herrmann, H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol* **148**, 137–52 (2004).
- [193] Paulin, D. & Li, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* **301**, 1–7 (2004).
- [194] Shah, S. B. *et al.* Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J* **86**, 2993–3008 (2004).
- [195] Debus, E., Weber, K. & Osborn, M. Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. *EMBO J* **2**, 2305–12 (1983).
- [196] Brachvogel, B. *et al.* Isolated anxa5+/sca-1+ perivascular cells from mouse meningeal vasculature retain their perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* **313**, 2730–43 (2007).
- [197] Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Rancel, N. & Valladares, F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* **6**, 269–86 (1991).
- [198] Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* **7**, 452–64 (2005).
- [199] Mandarino, L. J., Sundarraj, N., Finlayson, J. & Hassell, H. R. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* **57**, 609–21 (1993).
- [200] Abramsson, A., Lindblom, P. & Betsholtz, C. Endothelial and nonendothelial sources of pdgf-b regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* **112**, 1142–51 (2003).
- [201] Rudini, N. *et al.* Ve-cadherin is a critical endothelial regulator of tgfbeta signalling. *EMBO J* **27**, 993–1004 (2008).
- [202] Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–95 (1990).

- [203] Takamori, Y. *et al.* Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex. *Brain Res* **1270**, 10–8 (2009).
- [204] Howson, K. M. *et al.* The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1396–407 (2005).
- [205] Dore-Duffy, P., Katychiev, A., Wang, X. & Van Buren, E. Cns microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 613–24 (2006).
- [206] Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P. J. & Pessac, B. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase n, aminopeptidase a, and nestin. *J Neurosci Res* **58**, 367–78 (1999).
- [207] Lardon, J., Rooman, I. & Bouwens, L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* **117**, 535–40 (2002).
- [208] Ehrmann, J., Kolár, Z. & Mokry, J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* **58**, 222–3 (2005).
- [209] Almqvist, P. M., Mah, R., Lendahl, U., Jacobsson, B. & Henderson, G. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. *J Histochem Cytochem* **50**, 147–58 (2002).
- [210] Sugawara, K.-i. *et al.* Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest* **82**, 345–51 (2002).
- [211] Oikawa, H., Hayashi, K., Maesawa, C., Masuda, T. & Sobue, K. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* (2009).
- [212] Hartmann, U. & Maurer, P. Proteoglycans in the nervous system—the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* **20**, 23–35 (2001).
- [213] Bovolenta, P. & Feraud-Espinosa, I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* **61**, 113–32 (2000).
- [214] Levine, J. M. & Nishiyama, A. The ng2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multi-functional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* **3**, 245–59 (1996).
- [215] Stallcup, W. B. & Dahlin-Huppe, K. Chondroitin sulfate and cytoplasmic domain-dependent membrane targeting of the ng2 proteoglycan promotes retraction fiber formation and cell polarization. *J Cell Sci* **114**, 2315–25 (2001).

- [216] Levine, J. M., Reynolds, R. & Fawcett, J. W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* **24**, 39–47 (2001).
- [217] Witmer, A. N., van Blijswijk, B. C., van Noorden, C. J. F., Vrensen, G. F. J. M. & Schlingemann, R. O. In vivo angiogenic phenotype of endothelial cells and pericytes induced by vascular endothelial growth factor-a. *J Histochem Cytochem* **52**, 39–52 (2004).
- [218] Chekenya, M. *et al.* The glial precursor proteoglycan, ng2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**, 367–80 (2002).
- [219] Schlingemann, R. O., Rietveld, F. J., de Waal, R. M., Ferrone, S. & Ruiter, D. J. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol* **136**, 1393–405 (1990).
- [220] Covas, D. T. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with cd146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* **36**, 642–54 (2008).
- [221] Arthur, A., Zannettino, A. & Gronthos, S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* **218**, 237–45 (2009).
- [222] Dore-Duffy, P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* **14**, 1581–93 (2008).
- [223] Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z. & Bergers, G. Pdgfrbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* **7**, 870–9 (2005).
- [224] Cancedda, R. & Dozin, B. Serum-free medium for mesenchymal stem cells. *Patent Nr.:7109032* (2006).
- [225] Kinner, B., Zaleskas, J. M. & Spector, M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **278**, 72–83 (2002).
- [226] Bach, T. L. *et al.* Ve-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res* **238**, 324–34 (1998).
- [227] Breviario, F. *et al.* Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7b4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1229–39 (1995).
- [228] Carmeliet, P. Developmental biology. one cell, two fates. *Nature* **408**, 43, 45 (2000).

- [229] Asahara, T. *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**, 221–8 (1999).
- [230] Yamashita, J. *et al.* Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92–6 (2000).
- [231] Moretti, A. *et al.* Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* **127**, 1151–65 (2006).
- [232] Kattman, S. J., Huber, T. L. & Keller, G. M. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* **11**, 723–32 (2006).
- [233] Au, P., Tam, J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* **111**, 4551–8 (2008).
- [234] Göthert, J. R. *et al.* Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* **104**, 1769–77 (2004).
- [235] De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* **8**, 211–26 (2005).
- [236] Rajantie, I. *et al.* Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* **104**, 2084–6 (2004).
- [237] Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P. & Li, A. Contribution of bone marrow-derived pericyte precursor cells to corneal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3502–6 (2005).
- [238] Purhonen, S. *et al.* Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6620–5 (2008).
- [239] Sincock, P. M., Mayrhofer, G. & Ashman, L. K. Localization of the transmembrane 4 superfamily (tm4sf) member peta-3 (cd151) in normal human tissues: comparison with cd9, cd63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem* **45**, 515–25 (1997).
- [240] Sterk, L. M. T. *et al.* Association of the tetraspanin cd151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J Cell Sci* **115**, 1161–73 (2002).
- [241] Smith, M. E., Jones, T. A. & Hilton, D. Vascular endothelial cadherin is expressed by perineurial cells of peripheral nerve. *Histopathology* **32**, 411–3 (1998).

- [242] Bexell, D. *et al.* Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* **17**, 183–90 (2009).
- [243] Gavard, J. Breaking the ve-cadherin bonds. *FEBS Lett* **583**, 1–6 (2009).
- [244] Crosby, C. V. *et al.* Ve-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood* **105**, 2771–6 (2005).
- [245] Wautier, F., Wislet-Gendebien, S., Chanas, G., Rogister, B. & Leprince, P. Regulation of nestin expression by thrombin and cell density in cultures of bone mesenchymal stem cells and radial glial cells. *BMC Neurosci* **8**, 104 (2007).
- [246] Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E. & Stallcup, W. B. Ng2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* **222**, 218–27 (2001).
- [247] Miller, B., Sheppard, A. M., Bicknese, A. R. & Pearlman, A. L. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing cerebral cortex: the distribution of neurocan distinguishes forming afferent and efferent axonal pathways. *J Comp Neurol* **355**, 615–28 (1995).
- [248] Nishiyama, A., Lin, X. H., Giese, N., Heldin, C. H. & Stallcup, W. B. Co-localization of ng2 proteoglycan and pdgf alpha-receptor on o2a progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* **43**, 299–314 (1996).
- [249] Ozerdem, U., Monosov, E. & Stallcup, W. B. Ng2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature. *Microvasc Res* **63**, 129–34 (2002).
- [250] Grako, K. A. & Stallcup, W. B. Participation of the ng2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res* **221**, 231–40 (1995).
- [251] Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801–9 (1993).
- [252] Schwartz, S. M., Heimark, R. L. & Majesky, M. W. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* **70**, 1177–209 (1990).
- [253] Chekenya, M. *et al.* Ng2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in cns by sequestering angiostatin. *FASEB J* **16**, 586–8 (2002).
- [254] Goretzki, L., Lombardo, C. R. & Stallcup, W. B. Binding of the ng2 proteoglycan to kringle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasmin(ogen). *J Biol Chem* **275**, 28625–33 (2000).
- [255] Nico, B. *et al.* Desmin-positive pericytes in the chick embryo chorioallantoic membrane in response to fibroblast growth factor-2. *Microvasc Res* **68**, 13–9 (2004).

- [256] Asashima, T., Iizasa, H., Terasaki, T. & Nakashima, E. Rat brain pericyte cell lines expressing beta2-adrenergic receptor, angiotensin ii receptor type 1a, klotho, and cxcr4 mrnas despite having endothelial cell markers. *J Cell Physiol* **197**, 69–76 (2003).
- [257] Annabi, B. *et al.* Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* **21**, 337–47 (2003).
- [258] Keerl, S., Gehmert, S., Gehmert, S., Song, Y.-H. & Alt, E. Pdgf and bfgf modulate tube formation in adipose tissue-derived stem cells. *Ann Plast Surg* (2010).
- [259] Ball, S. G., Shuttleworth, C. A. & Kielty, C. M. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther* **10**, 57–71 (2010).
- [260] Aghi, M., Cohen, K. S., Klein, R. J., Scadden, D. T. & Chiocca, E. A. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res* **66**, 9054–64 (2006).
- [261] Annabi, B., Naud, E., Lee, Y.-T., Eliopoulos, N. & Galipeau, J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem* **91**, 1146–58 (2004).
- [262] Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R. L. & Shinnars, B. L. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* **19**, 167–72 (2000).
- [263] Bagley, R. G., Weber, W., Rouleau, C. & Teicher, B. A. Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res* **65**, 9741–50 (2005).
- [264] Akiyama, H. *et al.* Blood-brain barrier formation of grafted human umbilical vein endothelial cells in athymic mouse brain. *Brain Res* **858**, 172–6 (2000).
- [265] Guidolin, D. *et al.* Order and disorder in the vascular network. *Leukemia* **18**, 1745–50 (2004).
- [266] Taraboletti, G. & Giavazzi, R. Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer* **40**, 881–9 (2004).
- [267] Allt, G. & Lawrenson, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1–11 (2001).
- [268] Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15–23 (2003).

- [269] Betsholtz, C., Lindblom, P. & Gerhardt, H. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *EXS* 115–25 (2005).
- [270] Tigges, U., Hyer, E. G., Scharf, J. & Stallcup, W. B. Fgf2-dependent neovascularization of subcutaneous matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages. *Development* **135**, 523–32 (2008).
- [271] Nehls, V., Denzer, K. & Drenckhahn, D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* **270**, 469–74 (1992).
- [272] Redmer, D. A. *et al.* Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* **65**, 879–89 (2001).
- [273] Wesseling, P. *et al.* Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immunolight and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 304–10 (1995).
- [274] Nakamura, K. *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* **11**, 1155–64 (2004).
- [275] Lu, Y.-r. *et al.* The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **7**, 245–51 (2008).
- [276] Zhu, W. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* **80**, 267–74 (2006).
- [277] Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–63 (2007).
- [278] Gruber, R. *et al.* Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng* **11**, 896–903 (2005).
- [279] Schechner, J. S. *et al.* In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9191–6 (2000).
- [280] Koike, N. *et al.* Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* **428**, 138–9 (2004).
- [281] Lindblom, P. *et al.* Endothelial pdgf-b retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* **17**, 1835–40 (2003).
- [282] Chekenya, M. & Pilkington, G. J. Ng2 precursor cells in neoplasia: functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *J Neurocytol* **31**, 507–21 (2002).

-
- [283] Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* **111**, 1287–95 (2003).

Anhang A

Materialien

A.1 Zelllinien

| Material | Typ | Herkunft |
|----------------------------|--------|---|
| humane Endothelzellen | HUVEC | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| humane glatte Muskelzellen | HAoSMC | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Glioblastomzellen | U373 | freundliche Bereitstellung durch das Labor für exp. Neurochirurgie, Klinikum der Universität München, Deutschland |

A.2 Antikörper

| Material | Typ | Herkunft |
|--|-------------------------|--|
| Anti-NG2-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | Sigma, Saint Louis, MO, USA |
| Anti-Myosin (Smooth)-Ak | Maus, monoklonal, 1:500 | Sigma, Saint Louis, MO, USA |
| Anti-von Willebrand Faktor-Ak | Hase, 1:200 | Sigma, Saint Louis, MO, USA |
| Anti-Desmin-Ak | Maus, monoklonal, 1:40 | Sigma, Saint Louis, MO, USA |
| Anti-VE-Cadherin-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | R&D Systems, MN, USA |
| Anti- α -Smooth muscle actin-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | R&D Systems, MN, USA |
| Anti-Nestin-Ak | Hase, polyklonal, 1:200 | Chemicon International, Billerica, MA, USA |
| Anti-CD 151-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | R&D Systems, MN, USA |
| Anti-CD 11b-Ak | Maus, monoklonal, 1:200 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Anti-CD 14-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Anti-CD 31-Ak | Maus, monoklonal, 1:200 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Anti-CD 34-Ak | Maus, monoklonal, 1:250 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Anti-CD 44-Ak | Maus, monoklonal, 1:200 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |

Fortsetzung auf folgender Seite ...

Fortsetzung von vorheriger Seite

| Material | Typ | Herkunft |
|---------------------|--------------------------|---|
| Anti-CD 105-Ak | Maus, monoklonal, 1:100 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FITC-Anti-rabbit-Ak | Fluoresceinisothiocyanat | R&D Systems, MN, USA |
| TRITC-Anti-mouse-Ak | Rhodaminisothiocyanat | R&D Systems, MN, USA |

A.3 Kulturmedien, Puffer und Reagenzien

| Material | Typ | Herkunft |
|---------------------------|--|---|
| Wachstumsmedium | <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> , α -modifiziert | Sigma, Steinheim, Deutschland |
| Wachstumsmedium | <i>Endothelial Cell Growth Medium</i> | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Wachstumsmedium | <i>Smooth Muscle Cell Basal Medium 2</i> | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Zusatzmedium HUVEC Serum | ECGS/H <i>base medium</i> fetales bovines Serum (FBS) | PromoCell, Heidelberg, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Serum | Ziegenserum (<i>Normal Goat Serum</i> , NGS) | Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK |
| Glutamin | L-Glutamin, $\geq 98\%$ (TLC) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Antibiotika | Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Antimykotika | Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Wachstumsfaktor | <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Wachstumsfaktor | <i>Basic Fibroblast Factor</i> (bFF) | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Hormon | Hydrocortison (1 $\mu\text{g/ml}$) | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Hormon | Insulin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Puffer | Phosphat-Puffer (10x, Dulbecco's PBS) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Puffer | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Proteinolyse | 0.25% Trypsin-EDTA-Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| organisches Lösungsmittel | Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Farbstoff | 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |

Fortsetzung auf folgender Seite ...

 Fortsetzung von vorheriger Seite

| Material | Typ | Herkunft |
|--------------------------|--|---------------------------------------|
| Farbstoff | Trypanblau-Lösung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Färbepuffer | 10x (Tube Formation Assay) | Cell Biolabs, San Diego, CA, USA |
| Fluoreszenzfarbstoff | Calcein (1 μ M in DMSO) | Cell Biolabs, San Diego, CA, USA |
| ECM-Gel-Lösung | hergest. aus Engelbreth-Holm-Swarm-Tumorzellen | Cell Biolabs, San Diego, CA, USA |
| nichtionisches Tensid | Triton-X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Verblassungsschutz | <i>Flourescence Mounting Medium</i> | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Dichtegradient | Histopaque-1077 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| FACS-Kit | <i>Phosflow Starter Kit</i> | Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| Tube Formation Assay Kit | <i>In vitro angiogenesis</i> | Cell Biolabs, San Diego, CA, USA |

A.4 Verbrauchsmaterialien

| Material | Typ | Herkunft |
|------------------------------|-------------------------------------|--|
| serologische Vakuumpipetten | Costar Stripettes, 5, 10, 25 ml | Corning, Amsterdam, Niederlande |
| Kulturflaschen | 25, 75/80, 185 cm ² | Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellschaber | BT 55 | Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland |
| Pipetten/ Pipettenspitzen | 10, 200, 1000 μ l | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipettierhilfe | Pipetus-Akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | 1,5 ml/ 2,0 ml Eppendorf-Cups | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | 15 ml, 50 ml BlueMax Falcon | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien |
| Einfrierröhrchen | 1,8 ml | Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellsiebe | 70 μ m | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| 8-Well-Chamber-Slides | Lab-Tek, 0,8 cm ² /well | Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark |
| 96-Well-Platten | Nunc 96 MicroWell, 300 μ l/well | Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zentrifugenröhrchen | 10 ml, 25 ml | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien |
| Objektträger | 26 x 76 x 1 mm | Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland |

A.5 Geräte

| Material | Typ | Herkunft |
|--------------------------|---------------------|--|
| Gefrierschrank | -80° Celsius | Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland |
| Kühl- und Gefrierschrank | 4° und -25° Celsius | Siemens, München, Deutschland |
| Stickstofftonne | BT 55 | Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland |

 Fortsetzung auf folgender Seite ...

Fortsetzung von vorheriger Seite

| Material | Typ | Herkunft |
|----------------------|---|--|
| Inkubator | HeraCell | Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank | HeraSafe | Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland |
| Zentrifuge | Rotanta/K | Hettich Laborapparate, Bäch, Schweiz |
| Zytometer | FACScan Flow Cytometer | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Durchlichtmikroskop | CK 40 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Autoklav | Varioklav 400 | H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland |
| Floureszenzmikroskop | Axio B60 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Digitalkamera | Axio | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Zählkammer | Neubauer-Zählkammer, 0,0025 mm ² | Brand, Wertheim, Deutschland |

A.6 Software

| Material | Typ | Herkunft |
|-------------------------|-----------------------|---|
| Statistik | Microsoft Excel 2008 | San Diego, CA, USA |
| Grafik-Aufnahme | KS 300 | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Grafik-Aufnahme/Analyse | Axio Vision | Zeiss, Jena, Deutschland |
| Bildbearbeitung | Adobe PhotoShop CS3 | Adobe Systems, San Jose, CA, USA |
| Grafikbearbeitung | Adobe Illustrator CS3 | Adobe Systems, San Jose, CA, USA |
| FACS-Analyse | CellQuest | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |

Anhang B

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Straube für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas, die konstruktive Unterstützung und die allzeit offene Tür bei auftretenden Fragen und Problemen auch über den Rahmen meiner Dissertation hinaus.

Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich und Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Brandt danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Neurologie zu erstellen.

Bei Dr. Tobias Birnbaum möchte ich mich für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und Einführung in die Methodik der Immunfluoreszenzfärbung und Zellkultur bedanken.

Darüber hinaus möchte ich dem Team der Neurologischen Forschung für ihre Unterstützung in fachlichen und technischen Fragen danken, insbesondere Frau Dr. med. Petra Sostak, Herrn Dr. med. Christoph Schankin, Herrn Dr. rer. hum. biol. Joachim Hecht und Sigrid Langer.

Dem Team aus der neurochirurgischen Forschung um ehemals Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner danke ich für die Einführung in die Methodik der Stammzell-Isolierung und der computergestützten Auswertung der Bilddaten sowie für die Nutzung der Geräte und Materialien.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern und besonders bei den Spendern der Stiftung *Aktion Knochenmarkspende Bayern e. V.* in Gauting für die freundliche Überlassung des Restmaterials der Knochenmarkspende.

Abschließend möchte ich meiner Familie, Dr. Hartmut, Andrea und Kristof Hildebrandt, sowie Georg Nübling und seiner Familie für die wertvollen Anregungen, die vielen Korrekturlesungen und die insgesamt großartige Unterstützung während der Arbeit in besonderer Weise danken.